

Mikrobielle Diversität und Dynamik einer 1,2-Dichlorpropan dechlorierenden Mischkultur

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Dipl.-Ing. (FH) Cord Schlötelburg
20. August 1969, Oldenburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. T. Börner
2. Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel
3. Prof. Dr. H. Görisch

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2001

Zusammenfassung

Die toxische sowie kanzerogene Verbindung 1,2-Dichlorpropan (DCP) ist weit verbreitet in Industrie und Landwirtschaft. Die Verbindung zeigt eine geringe chemische Reaktivität, ist nur mäßig wasserlöslich und unter aeroben Bedingungen weitestgehend beständig gegenüber mikrobiellen Abbauprozessen in der Umwelt. Als Folge reichert sich DCP in Grundwässern, Sedimenten und Böden an und gefährdet über die Nahrungskette die Gesundheit von Mensch und Tier. Um DCP effizient und ökonomisch zu unbedenklichen Verbindungen abzubauen, wurden mikrobielle Mischkulturen aus belasteten Sedimenten angereichert und in einen Wirbelschichtreaktor überführt. Dieses Verfahren ermöglichte eine kontinuierliche anaerobe Dechlorierung von DCP zu Propen.

Grundsätzlich stellen biologische Abbauverfahren, bei denen komplexe mikrobielle Mischpopulationen eingesetzt werden, einen vielversprechenden Weg zur Transformation chlororganischer Verbindungen dar. Jedoch liegen üblicherweise nur wenige Informationen über die Zusammensetzung der betreffenden Populationen vor, so daß eine Optimierung bzw. effiziente Steuerung des Prozesses erheblich erschwert wird. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der mikrobiellen Zusammensetzung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation. Aufgrund der bekannten Limitierungen klassisch-mikrobiologischer Nachweisverfahren wurde eine Kombination mehrerer molekulargenetischer Methoden eingesetzt, die auf der vergleichenden Sequenzanalyse ribosomaler RNA beruhten. Die Untersuchungen zeigten, daß die Bakterienpopulation des Reaktors außerordentlich divers zusammengesetzt war und im wesentlichen aus bislang nicht-kultivierten Arten bestand. Es dominierten "Grüne nicht-schwefelhaltige Bakterien" (green nonsulfur bacteria) sowie Grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Die Archaea hingegen waren fast ausschließlich durch zwei bekannte methanogene Spezies vertreten, *Methanosaeta concilii* sowie *Methanomethylovorans hollandica*. Der Vergleich der gewonnenen rDNA-Daten mit denen anderer Lebensräume ergab, daß Süßwasserhabitats, in denen chlororganische Verbindungen reduktiv umgesetzt werden, offenbar eine spezifische Populationsstruktur aufweisen. Es konnten spezifische 16S rDNA-Gruppen definiert werden (SHA-Cluster), die auch nach längerem Reaktorbetrieb noch nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus wurden *Dehalobacter restrictus*- sowie *Dehalococcoides ethenogenes*-ähnliche Bakterien in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation gefunden. Beide Spezies sind in der Lage, chlororganische Verbindungen unter Verwendung von Wasserstoff als alleinigem Elektronendonator reduktiv zu dechlorieren. Es ist davon auszugehen, daß *Dehalobacter* und *Dehalococcoides* spp. aufgrund ihrer Physiologie an der reduktiven Umsetzung des DCPs beteiligt sind. Die Untersuchung der Population über einen längeren Zeitraum zeigte überdies, daß Bakterien der Gattung *Dehalobacter* überproportional angereichert

und daraufhin zur dominierenden Spezies im Reaktor wurden. Dieser Befund läßt auf eine zentrale Rolle von *Dehalobacter* spp. bei der Transformation von DCP zu Propen schließen. Konsequenterweise führte die Zugabe von Wasserstoff zum Reaktor zur einer deutlichen Steigerung des DCP-Umsatzes. *Dehalobacter* und *Dehalococcoides* spp. sowie die anderen durch SHA-Cluster repräsentierten Bakterien stellen potentielle Indikatororganismen für die DCP-Transformation im Reaktor dar. Ein kontinuierliches Monitoring dieser Bakterien würde zu einer effizienteren Steuerung des Dechlorierungsprozesses und damit zu einer Optimierung des Verfahrens führen.

Schlagwörter: 1,2-Dichlorpropan, reduktive Dechlorierung, 16S rRNA, *Dehalobacter restrictus*

Abstract

The toxic and carcinogenic compound 1,2-dichloropropane (DCP) is widely used in industry and agriculture. DCP shows a low chemical reactivity. It is only moderately soluble in aqueous systems and almost recalcitrant to microbial degradation under aerobic conditions. As a consequence DCP accumulates in groundwater, sediments and soil, thus endangering humans and animals via the food chain. To efficiently transform DCP to harmless organic compounds microbial mixed cultures have been enriched from sediments and were subsequently transferred into a fluidized bed bioreactor. This process allowed a continuous anaerobic dechlorination of DCP to propene.

Bioreactor processes using complex microbiota represent a promising technology for transformation of chlorinated compounds. However, the composition of the used population is usually unknown, hence hindering both optimization and control of the degradation process. Subject of this work was the analysis of the microbial diversity of the DCP-dechlorinating bioreactor population. Conventional culture-dependent microbiological methods are often limited if used for the analysis of complex communities. Therefore, a combination of different molecular methods based on comparative 16S rRNA analysis was applied. It was found that the bioreactor population was highly diverse and consisted mainly of as yet-uncultured bacteria. Members of the green nonsulfur bacteria and the gram-positive bacteria with low G+C content dominated the consortium. In contrast the archaea were represented by only two species, *Methanosaeta concilii* and *Methanomethylovorans hollandica*. The comparison of the rDNA data with those of other biotopes revealed that reductively dechlorinating freshwater habitats show a specific community structure. 16S rDNA-clusters were defined, which could still be detected after a longer operation time of the bioreactor. Furthermore, *Dehalobacter restrictus*- and *Dehalococcoides ethenogenes*-like bacteria were found in the DCP-dechlorinating bioreactor population. Both species are capable of reductive dechlorination using hydrogen as the sole electron source. Therefore, it could be assumed that these bacteria were also involved in the dechlorination of DCP. The investigation of the bioreactor population for a longer period of time revealed that *Dehalobacter*-like bacteria were significantly enriched and subsequently became the most frequently found bacterium within the bioreactor. This indicates a major role of *Dehalobacter* spp. within the transformation process of DCP to propene. Consequently, the addition of hydrogen to the bioreactor led to an increase of the DCP transformation rate. *Dehalobacter* und *Dehalococcoides* spp. as well as the bacteria represented by the specific SHA-clusters are possibly suitable as indicator organisms for the transformation of DCP within the bioreactor. A continuous monitoring of these bacteria would lead to a more efficient control and hence, to an optimization of the transformation process.

Keywords: 1,2-dichloropropane, reductive dechlorination, 16S rRNA, *Dehalobacter restrictus*

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	I
	Abstract	III
	Inhaltsverzeichnis	V
	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Chlorierte Kohlenwasserstoffe.....	1
1.2	1,2-Dichlorpropan (DCP).....	1
1.2.1	Eigenschaften von DCP.....	1
1.2.2	Herkunft und Verwendung von DCP.....	2
1.2.3	Vorkommen von DCP in der Umwelt.....	3
1.3	Mikrobielle Transformation von 1,2-Dichlorpropan.....	5
1.3.1	Aerobe mikrobielle Transformation.....	5
1.3.2	Anaerobe mikrobielle Transformation.....	6
1.4	Technische Verfahren mikrobieller Dechlorierung.....	9
1.5	Molekulare Analyse mikrobieller Diversität.....	10
1.6	Ziel der Arbeit.....	15
1.7	Analyseschema.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien.....	18
2.2	Puffer, Nährmedien und sonstige Lösungen.....	20
2.3	Biochemikalien und Kits.....	23
2.4	Oligonukleotide.....	24
2.5	Kontrollstämme.....	25
2.6	Entnahme von Flußsedimentproben, Kultivierung der mikrobiellen Sedimentpopulation und Probenentnahme aus dem Bioreaktor.....	26
2.7	Präparation der DNA aus den Bioreaktorproben.....	28
2.8	Analyse der Bioreaktorproben anhand von 16S rDNA- Klonbibliotheken.....	29
2.8.1	PCR-Amplifikation der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben.....	29
2.8.2	Agarosegelelektrophorese der 16S rDNA-Amplifikate.....	30
2.8.3	Klonierung der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben.....	30
2.8.4	Plasmidpräparation.....	31
2.8.5	Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken durch Sequenzierung.....	32
2.8.6	Phylogenetische Analyse der 16S rDNA Sequenzen.....	33

2.8.7	Analyse der bakteriellen 16S rDNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit Polynukleotidsonden.....	33
2.8.8	Analyse der Archaea-16S rDNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden.....	35
2.9	Analyse der Bioreaktorproben mittels Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE).....	36
2.9.1	Amplifikation und Trennung der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben.....	36
2.9.2	Analyse der 16S rDNA-Fragmente ausgewählter DGGE-Banden.....	37
2.10	Analyse der Bioreaktorproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR (QE-PCR)...	37
2.11	Analyse der Bioreaktorproben durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	39
2.11.1	Fixierung und Vorbehandlung des Zellmaterials.....	39
2.11.2	Hybridisierung der Mikroorganismen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden und Färbung mit DAPI.....	39
2.11.3	Mikroskopischer Nachweis.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Probenentnahme aus dem Bioreaktor.....	41
3.2	DNA-Extraktion aus den Bioreaktorproben.....	41
3.3	Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken.....	42
3.3.1	Anlage der 16S rDNA-Klonbibliotheken.....	42
3.3.2	Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliothek A.....	43
3.3.3	Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliotheken B und C.....	54
3.3.4	Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliothek D.....	56
3.3.5	Bestimmung chimärer 16S rDNA-Sequenzen.....	61
3.4	Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch DGGE.....	62
3.4.1	Analyse des DGGE-Gels.....	62
3.4.2	Analyse ausgewählter DGGE-Banden.....	65
3.5	Analyse der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch QE-PCR.....	67
3.6	Nachweis von Bakterien und Archaea der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch FISH.....	70
3.7	DCP-Dechlorierung der Bioreaktorpopulation nach Zugabe von Wasserstoff.....	75

4	Diskussion	76
4.1	Mikrobielle Diversität der DCP-dechlorierenden Population.....	76
4.1.1	Methodischer Ansatz.....	76
4.1.2	Einfluß experimenteller Faktoren auf die PCR-vermittelte Diversitätsanalyse.....	78
4.1.3	Bakterielle Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation.....	80
4.1.4	Archaeale Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation.....	86
4.2	Veränderung der DCP-dechlorierenden Population im Bioreaktor.....	87
4.2.1	Untersuchung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation mittels DGGE.....	88
4.2.2	Untersuchung der mikrobiellen Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation anhand von Klonbibliothek D.....	90
4.2.3	Quantifizierung <i>Dehalobacter restrictus</i> -ähnlicher 16S rDNA in der DCP- dechlorierenden Bioreaktorpopulation.....	91
4.2.4	Untersuchung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch FISH.....	93
4.3	Rückschlüsse auf den Metabolismus der DCP-dechlorierenden Bioreaktorkultur.....	95
4.4	Schlußfolgerungen.....	98
5	Literatur	100
6	Anhang	111
	Publikationen	XI
	Lebenslauf	XIII
	Danksagung	XIV
	Eidesstattliche Erklärung	XV

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
a	Jahr
A	Adenin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDRA	Amplifizierte-Ribosomale-DNA-Restriktionsanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
Bakt.	Bakterien
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	zenti
c	Konzentration
CB	Chlorbenzole
CBT	Chlorbenzoat
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
CP	Crossing Point
CP	substituierte Chlorphenole
CS	Sorenson-Index
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-Doxetan-3,2'(5'Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] Decan}-4-yl)-Phenylphosphat
Cy3	Cyanin3
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCE	cis-1,2-Dichlorethen
DCP	1,2-Dichlorpropan
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DIG-11-dUTP	Digoxigenin-11-2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Edit	Editor/Editoren
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
etc.	etcetera
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GC	Guanin/Cytosin-Gehalt
GNS	Grüne nicht-schwefelhaltige Bakterien
h	hekto
h	Stunde(n)
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
k	kilo
kb	Kilobasenpaar
KOC	Bodensorptionskoeffizient
L	Liter
ls	große Untereinheit (large subunit)
m	Meter, milli
M	molar
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
μ	mikro
min	Minute(n)
n	nano
p	piko
Pa	Pascal
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCE	Tetrachlorethen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCP	Pentachlorphenol
PU	Polyurethan
QE-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
rA	relative Abundanz
RAPD	Zufalls-Amplifizierte-Polymorphe-DNA
RClx	Chlorrest
Rf	relative Mobilität
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Anzahl der distinkten Banden pro Spur im DGGE-Gel
S	Svedberg
S	Probe
s	siehe
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
SH	Saale-Halle
sog.	sogenannte, sogenannten
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
ss	kleine Untereinheit (small subunit)
SSC	Sodium Saline Citrat
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus
t	Tonnen
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TB	Terrific Broth
TBE	Tris
TCB	Trichlorbenzol
TCE	Trichlorethen
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat
TGGE	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese
TRFLP	Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
TSS	Tris-Natriumchlorid-Sodiumdodecylsulfat
U	Unit
U	Uracil
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
VC	Vinylchlorid
Verbb.	Verbindungen
versch.	verschiedene
VT	Volumenteil(e)
v/v	Volumen/Volumen
X-Gal	5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Chlorierte Kohlenwasserstoffe

Chlor ist eines der am weitestverbreiteten chemischen Elemente in der Natur. In unterirdischen Lagern und in den Weltmeeren ist Chlor in Form von Stein- bzw. Meersalzen in ungeheuer großen Mengen vorhanden. Das außerordentlich reaktionsfähige Chlor reagiert bereits bei niedrigen Temperaturen mit den relativ reaktionsträgen petrochemischen Grundstoffen. Für die daraus entstehenden Chlorkohlenwasserstoffe (CKW) und Chloraromaten liegt die Energie zur Trennung der Bindung zwischen Chlor- und Kohlenstoffatom in einer Größenordnung, die einen leichten Austausch gegen andere Elemente oder Gruppen erlaubt. Demzufolge spielen chlorierte Kohlenwasserstoffe als End- sowie Zwischenprodukte chemischer Synthesen eine herausragende Rolle in der chemischen Industrie und haben eine Vielzahl unterschiedlichster Anwendungen (zur Übersicht s. Starnick, 1999).

Aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften verfügen chlorierte organische Verbindungen über ein erhebliches öko- wie auch humantoxikologisches Potential. Vor allem schlecht wasserlösliche Verbindungen, wie polychlorierte Biphenyle (PCB) oder Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), akkumulieren in der Umwelt und gefährden den Menschen über die Nahrungskette. In den vergangenen Jahren wurde die Verwendung und Produktion zahlreicher chlorierter Substanzen daher eingestellt oder eingeschränkt. Dazu gehören u.a. eine Vielzahl chlorierter Lösemittel, Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) und CKW-haltige Pflanzenschutzmittel, wie z.B. DCP-haltige Substanzen zur Bodenbegasung.

1.2 1,2-Dichlorpropan (DCP)

1.2.1 Eigenschaften von DCP

DCP ($C_3H_6Cl_2$) ist eine farblose, brennbare und nach Chloroform riechende Flüssigkeit, die stabil bei Raumtemperatur, jedoch leicht flüchtig und entzündlich ist (BUA, 1995). Die wesentlichen chemischen und physikalischen Daten sind in Tab. 1.1 zusammengefaßt. DCP weist eine geringe bis mittlere Bodensorption auf (K_{oc} (DCP): 288 – 414; BUA, 1995). Es ist im Boden mobil und kann daher schnell zur wassergesättigten Zone vordringen. DCP wird der Wassergefährdungsklasse 3 zugeordnet und ist somit als stark wassergefährdend eingestuft.

DCP wird über die Atemwege bzw. den Magen-Darmtrakt resorbiert. Bei der resorptiven Vergiftung von Menschen durch DCP sind als Folgen hauptsächlich Leber- und Nierenfunktionsstörungen, hämolytische Anämie, Herzmuskelschwäche sowie Schock bekannt.

Tab. 1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften von DCP (BUA, 1995).

Eigenschaft	Wert
Dampfdruck (25°C)	66.6 hPa
Dichte (25°C)	1.16 g/cm ³
Molekulargewicht	113 g/mol
Siedepunkt	96.6°C
Wasserlöslichkeit (20°C)	2.8 g/L

Die orale Aufnahme größerer Mengen DCP (ca. 50 mL/70 kg Körpergewicht) kann tödlich verlaufen. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von DCP beträgt 350 mg/m³. Von der MAK-Kommission wurde DCP als Stoff mit begründetem Verdacht auf krebserregendes Potential eingestuft. In Tierversuchen wurde die Ausbildung von Leberkrebs bei Mäusen sowie Brustkrebs bei weiblichen Ratten beobachtet (ATSDR, 1989). Darüber hinaus erwies sich DCP in vitro als mutagen und chromosomenschädigend.

1.2.2 Herkunft und Verwendung von DCP

Bislang ist keine natürliche Quelle von DCP beschrieben worden. Es fällt hauptsächlich als Nebenprodukt bei der industriellen Produktion von Propylenoxid und Epichlorhydrin durch das Chlorhydrinverfahren an (BUA, 1995). Propylenoxid wird überwiegend (65-70%) zur Herstellung von Propylenglykolen verwendet, einer Vorstufe von Polyurethanen (Kahlich et al., 1993). Epichlorhydrin findet Verwendung bei der Herstellung von Epoxidharzen sowie bei der technischen Synthese von Glycerin (Sienel et al., 1987).

In den in Deutschland bestehenden Industrieanlagen zur Produktion von Propylenoxid und Epichlorhydrin fielen im Jahr 1991 77662 t DCP an (BUA, 1995). Abb. 1.1 schlüsselt die weitere Verwendung des DCPs auf. Über die Hälfte des produzierten DCPs wird zur Herstellung von Perchlorethylen und Tetrachlormethan weiterverarbeitet. Die verbleibende Menge wird etwa zu gleichen Teilen direkt entsorgt, d.h. verbrannt bzw. deponiert oder exportiert sowie andersweitig verwertet (BUA, 1995).

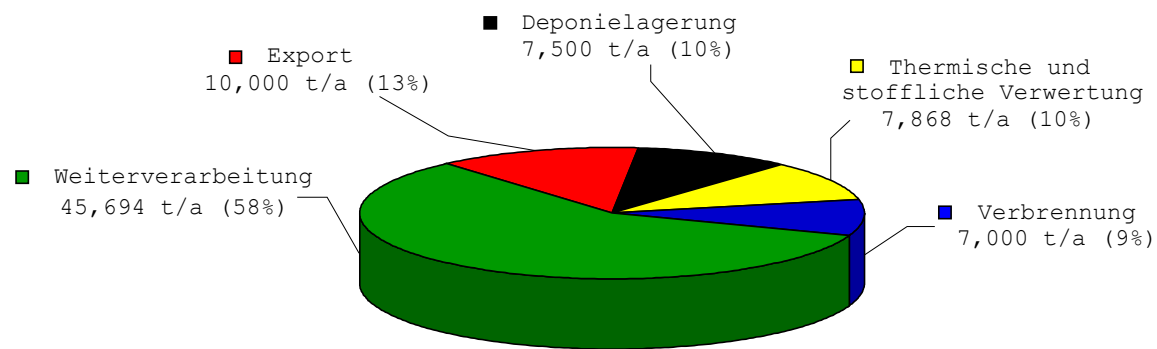


Abb. 1.1 Verbleib des bei der Produktion von Propylenoxid und Epichlorhydrin anfallenden DCPs in Deutschland (BUA, 1995).

Hauptsächlich fand DCP als Bestandteil von Pflanzenschutzmitteln Verwendung. Gemische aus DCP und 1,3-Dichlorpropen (Produktnamen: D-D-Vidden, Di-Trapex) wurden als Bodenbegasungsmittel zur Bekämpfung von Nematoden eingesetzt und waren in Europa und den USA weit verbreitet. In diesen Schädlingsbekämpfungsmitteln war bis 1984 ein Anteil von bis zu 25% DCP als aktive Komponente enthalten (Merriman et al., 1991). Die Verwendung dieser Substanzen führte zu einer Akkumulation von DCP in Grundwässern und Böden vorwiegend ländlicher Gebiete, so daß der DCP-Gehalt in Pflanzenschutzmitteln als Konsequenz auf maximal 0.5% gesenkt worden ist (Produktnamen: Vidden D, Telone). Der 0.5-prozentige DCP-Anteil entstand prozeßbedingt als Nebenprodukt bei der Synthese von 1,3-Dichlorpropen. Seit 1994 ist die Anwendung von DCP-enthaltenden Pflanzenschutzmitteln generell untersagt (BUA, 1995).

Heute findet DCP eine vielseitige Anwendung in Forschung und Industrie. Es wird als Lösemittel für Öl, Fette, Kautschuk und Harz sowie als Fleckenentferner für Textilien, als Scheuermittelbestandteil, Metallreiniger sowie Galvanisierungsmittel eingesetzt (IARC, 1986; ATSDR, 1989; Langer, 1986). Darüber hinaus wird DCP bei der Herstellung von Bautenschutzmitteln und Dachpappen eingesetzt, da es Bitumen, Asphalt sowie Teer zu lösen vermag (Langer, 1986). Auch als Flammschutz- und Imprägnierungsmittel sowie als sog. Scavenger in Antiklopfmitteln kommt DCP in der Industrie zum Einsatz.

1.2.3 Vorkommen von DCP in der Umwelt

Das bei der Produktion von Propylenoxid bzw. Epichlorhydrin anfallende DCP sowie die langjährige Verwendung von DCP-enthaltenden Schädlingsbekämpfungsmitteln führte zu einer erheblichen Belastung der Umwelt. Im Rahmen einer größeren Studie wurden Grundwässer über 200 landwirtschaftlicher Gebiete in Deutschland zur Ermittlung der Konzentration von DCP beprobt. Die Messungen ergaben DCP-Konzentrationen zwischen 0.05 und 5.1 µg/L. Von der europäischen Union wurde als Richtwert für die Konzentration

von DCP in Trinkwasser ein Wert von maximal 1 µg/L festgelegt (Rippen, 1994). Die Berliner Liste legt eine Pestizidkonzentration im Grundwasser von 1 µg/L als sogenannten „Eingreifwert“ fest (Berliner Liste, 1996).

Im Gegensatz zu Deutschland wurden in den Niederlanden noch deutlich höhere Belastungen der Umwelt durch DCP festgestellt. Messungen im Gebiet um Drenthe ergaben DCP-Konzentrationen von 0.05 – 165 µg/L in einer Vielzahl unterschiedlicher Grundwasserproben. In einem zur Trinkwassergewinnung verwendeten Grundwasser am gleichen Standort fanden sich Konzentrationen von bis zu 9.3 µg/L DCP. Die hohe Belastung des genannten Bereichs wurde auf eine intensive Verwendung der Schädlingsbekämpfungsmittel D-D-Vidden bzw. Di-Trapex in den Jahren um 1968 zurückgeführt (Leistra und Boesten, 1989). Auch an weiteren Standorten in den Niederlanden sind erhebliche Grundwasserschadensfälle durch einen hohen DCP-Eintrag zu verzeichnen (bis zu 200 µg/L; Beitz et al., 1994).

Die Verwendung DCP-haltiger Bodenbegasungsmittel in der Vergangenheit hat auch auf dem nordamerikanischen Kontinent hohe Grundwasserbelastungen verursacht. Dies bestätigte eine Studie, in der eine Vielzahl unterschiedlicher Grundwässer ländlicher sowie städtischer Areale der USA hinsichtlich des DCP-Gehalts analysiert worden waren (Squillace et al., 1999). Die Messungen ergaben Werte von 0.2 bis 10 µg/L DCP in ländlichen Regionen, während die Proben aus städtischen Gebieten lediglich Werte zwischen 0.2 und 1 µg/L DCP aufwiesen. Andere Autoren aus den USA berichten von Grundwasserproben aus Kalifornien, in denen Belastungen von 1200 µg/L gemessen wurden (Holden, 1986). Obwohl in den 80er Jahren der DCP-Anteil in Schädlingsbekämpfungsmitteln drastisch reduziert wurde, ergaben Messungen in kanadischen Grundwässern in den Jahren 1991 bis 1994 konstante Konzentrationen von durchschnittlich 2.2 µg/L. Das ebenfalls untersuchte 1,2-Dichlorpropen konnte dagegen nur über kurze Zeit in den Proben gefunden werden (Grove et al., 1998). Diese Messungen verdeutlichen, daß DCP eine überaus hohe Verweilzeit in der Umwelt aufweist und somit eine stetige Belastung für die Umwelt darstellt.

In Deutschland lassen sich die bekannten aktuellen Schadensfälle, die mit einer Kontamination durch DCP einhergehen, nicht auf eine extensive Verwendung DCP-haltiger Schädlingsbekämpfungsmittel in der Vergangenheit zurückführen. Vielmehr stellen ohnehin stark mit Chemikalien belastete Standorte, wie die Gelände von Chemiewerken und Mülldeponien, eine stetige Quelle des Eintrags gefährdender Substanzen in die Biosphäre dar. In Sondermülldeponien entstehen hochbelastete Sickerwässer, in denen DCP-Konzentrationen zwischen 320 und 4000 µg/mL nachgewiesen wurden (Brack et al., 1998). Auf dem Gelände eines Chemieunternehmens in Berlin wurden im Grundwasser DCP-Konzentrationen zwischen 34 und 1200 µg/L ermittelt (Meierling, 1998). Die Produktion von Propylenoxid in der ehemaligen DDR

fürte zu einem umfangreichen Schadensfall in der Nähe von Schönebeck. Das als Nebenprodukt anfallende DCP wurde in einer Salzkaverne zwischengelagert und führte zu einer Kontamination des salzgesättigten Solewassers (BUA, 1995). In der zu dekontaminierenden Sole (50000 m³) sind neben einer Vielzahl anderer Chlororganika 128 mg/L DCP enthalten.

1.3 Mikrobielle Transformation von 1,2-Dichlorpropan

Chlorierte organische Verbindungen anthropogenen Ursprungs gelten unter natürlichen Bedingungen als schwer abbaubar. Die Abbaubarkeit wird sowohl von der Anzahl als auch der Position der Chlorsubstituenten beeinflusst. Die hohe Elektronegativität des Chloratoms erschwert die Oxidation des Kohlenstoffgerüsts durch Sauerstoff. Diese Tatsache wirkt sich insbesondere auf CKW mit mehr als einem Chlorsubstituenten aus. Grundsätzlich werden hochchlorierte Verbindungen leichter anaerob bzw. niedrig chlorierte Verbindungen leichter aerob transformiert. Zweifach chlorierte Verbindungen stellen einen Grenzfall dar, so daß im Falle des DCPs sowohl die aerobe als auch die anaerobe Umsetzung möglich ist.

1.3.1 Aerobe mikrobielle DCP-Transformation

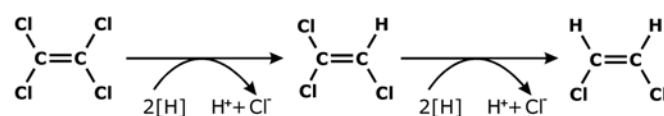
Neben einer nur geringen Zahl chlorierter Aliphaten, die von aeroben Mikroorganismen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden können (Fetzner und Lings, 1994), werden die meisten dieser Verbindungen kometabolisch in Gegenwart von Monooxygenasen umgesetzt. Solche Abbauprozesse durch methanotrophe und nitrifizierende Bakterien wurden auch für DCP beschrieben. Im Falle der beiden nitrifizierenden Mikroorganismen *Nitrosomonas europaea* sowie *Nitrosolobus multiformis* wird die Umsetzung von DCP mit Hilfe einer Ammonium-Monooxygenase katalysiert (Rasche et al., 1990). Die Nitrifikation wird durch halogenierte Verbindungen gehemmt. Das methanotrophe Bakterium *Methylosinus trichosporium* OB3 ist ebenfalls in der Lage, DCP kometabolisch umzusetzen (Oldenhuis et al., 1989). Hier ist die lösliche Form des Enzyms Methan-Monooxygenase, die sich nur bei Kupfer-Limitierung ausbildet, für die Transformation von DCP verantwortlich.

Neben der kometabolischen Umsetzung von DCP durch die obengenannten Mikroorganismen, wurde auch ein Bakterium, *Pseudomonas fluorescens* PFL12, beschrieben, das offenbar in der Lage ist, unter aeroben Bedingungen DCP als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Vandenbergh und Kunka, 1988). Allerdings konnten in diesem Falle die Abbauprodukte der DCP-Transformation nicht nachgewiesen werden, so daß der Befund als nicht sicher zu werten ist.

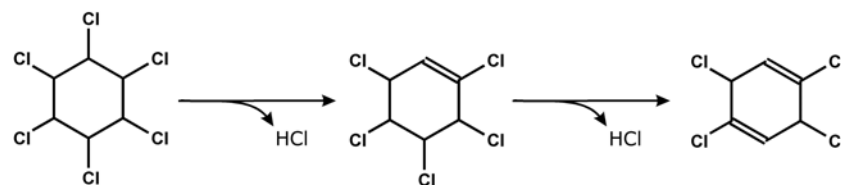
1.3.2 Anaerobe mikrobielle DCP-Transformation

Unter anaeroben Bedingungen werden chlororganische Verbindungen im allgemeinen durch reduktive Dechlorierung transformiert. Bei dieser Form der anaeroben Dechlorierung werden die Chlorsubstituenten abgespalten und Elektronen auf das Kohlenstoffgerüst übertragen, so daß entweder niedriger chlorierte oder vollständig dechlorierte Verbindungen entstehen. Die drei wesentlichen Mechanismen der reduktiven Dechlorierung sind in Abb. 1.2 veranschaulicht.

i) Sequentielle Dechlorierung



ii) Dehydrodehalogenierung



iii) Dihaloelimination

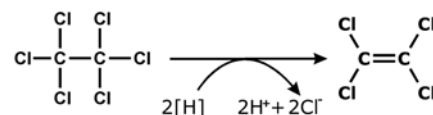


Abb. 1.2 Mechanismen der reduktiven Dechlorierung. i) Sequentielle Dechlorierung von PCE(Diekert, 1995), ii) Dehydrodehalogenierung von Lindan (Fetzner, 1998), iii) Dihaloelimination von Hexachlorethan (Criddle et al., 1986).

Bei der sequentiellen reduktiven Dechlorierung werden die Chlorsubstituenten aus Alkylchloriden durch Wasserstoff ersetzt (Bouwer und Wright, 1988; Mohn und Tiedje, 1992). Dieser Abbauweg wurde für eine Vielzahl chlorierter Verbindungen, u.a. für Tetra- (PCE) und Trichlorethen (TCE), beschrieben (Holliger und Schraa, 1994; Diekert, 1995). Die Dehydrodehalogenierung ist bei der anaeroben Dechlorierung von Lindan (Hexachlorcyclohexan) beobachtet worden (Fetzner, 1998). Hier wird HCl aus dem chlororganischen Substrat unter Bildung einer Kohlenstoffdoppelbindung abgespalten. Im Falle der Dihaloelimination (auch: vicinale Reduktion), die beispielsweise bei der Umsetzung von Hexachlorethan zu Tetrachlorethan nachgewiesen wurde (Criddle et al., 1986), werden zwei Chlorsubstituenten von benachbarten Kohlenstoffatomen einer

chloraliphatischen Verbindung abgespalten. Auch hier entsteht im Anschluß eine Kohlenstoffdoppelbindung. Eine seltenere nicht-respiratorische Form der reduktiven Dechlorierung ist durch die Abspaltung der Chlorsubstituenten chlorierter C_2 - und C_3 -Karbonsäuren durch einige schwefelfreie Purpurbakterien gekennzeichnet (McGrath und Harfoot, 1997). Die dabei entstehenden dechlorierten Karbonsäuren werden von den Mikroorganismen phototroph assimiliert.

Eine Ausnahme stellen die beiden homoacetogenen Bakterien *Dehalobacterium formicoaceticum* Stamm DMC (Mägli et al., 1996) sowie *Acetobacterium dehalogenans* Stamm MC (Traunecker et al., 1991) dar. Sie sind in der Lage, Chlormethan bzw. Dichlormethan im Zuge einer Alkyltransferreaktion zu dechlorieren, bei der die Alkylgruppe des chlorierten Methans auf Kohlendioxid übertragen wird. Hierbei handelt es sich um eine anaerobe, jedoch nicht-reduktive Dechlorierung.

Ähnlich zur aeroben Dechlorierung kann die reduktive Dechlorierung entweder metabolisch oder kometabolisch ablaufen (Abb. 1.3). Bei der letzten Reaktion handelt es sich um eine exergone Transformation, die von diversen fakultativ oder obligat anaeroben Mikroorganismen durch verschiedene Enzymsysteme katalysiert werden kann. Dieser exergone Umsatz führt zu keinem direkten Nutzen für den betreffenden Mikroorganismus (Holliger und Schraa, 1994). Kometabolische reduktive Dechlorierungsreaktionen wurden bei methanogenen, acetogenen, sulfat- und eisenreduzierenden Mikroorganismen beim Umsatz halogenierter Aliphate beobachtet und sind als initialer Schritt in der anaeroben Degradation chlororganischer Verbindungen zu betrachten (Fetzner, 1998). Solche Reaktionen stellen im allgemeinen das Ergebnis einer Syntrophie dar, d.h. einer engen Interaktion zwischen unterschiedlichen Mikroorganismen, die aufeinander angewiesen sind (Sharak-Genthner et al., 1990; Häggblom et al., 1996).

Im Gegensatz zur kometabolischen reduktiven Dechlorierung hat die metabolische reduktive Dechlorierung einen direkten Nutzen für den betreffenden Mikroorganismus. In diesem Fall dient der chlorierte Kohlenwasserstoff als Elektronenakzeptor und wird im Verlauf der Reaktion reduziert. Bei diesem Prozeß der „Chloratmung“, die auch als respiratorische Dechlorierung bezeichnet wird, kommt es zur ATP-Synthese, also zum direkten Energiegewinn durch Elektronentransportphosphorylierung (Diekert, 1995). Eine Voraussetzung für die Energiegewinnung ist das Vorliegen einer exergonen Reaktion, d.h. das Redoxpaar $RCIx/RCIx-1$ muß ein positives Redoxpotential aufweisen (Holliger und Schumacher, 1994). Als Elektronendonator spielt Wasserstoff eine zentrale Rolle.

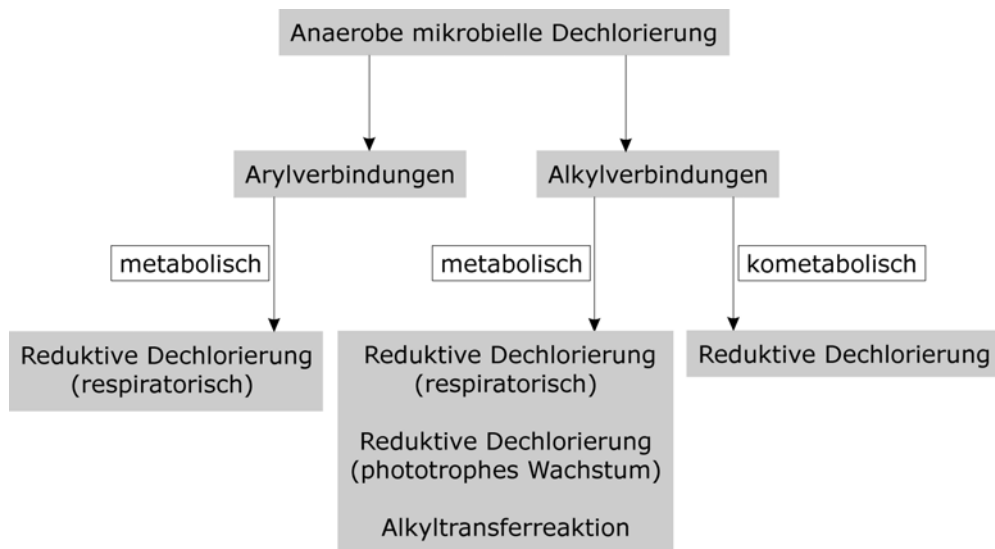


Abb. 1.3 Übersicht über die bei anaeroben oder fakultativ anaeroben Mikroorganismen beobachteten Strategien zur Dechlorierung chloraliphatischer und chloraromatischer Verbindungen.

Die Mikroorganismen, die chlororganische Verbindungen durch respiratorische Dechlorierung umzusetzen vermögen, sind u.a. dadurch charakterisiert, daß sie die Energiegewinnung durch reduktive Dechlorierung an Zellwachstum koppeln können (Löffler et al., 1999). Da solche Bakterien in natürlichen Habitaten zumeist in metabiotischer Wechselwirkung mit einer komplexen mikrobiellen Flora vorkommen, ist die Isolierung solcher Mikroorganismen erheblich erschwert. Demzufolge ist die Anzahl bislang bekannter chlororespirierender Mikroorganismen relativ gering (Tab. 1.2). Hinzu kommt, daß viele chlororganische Verbindungen toxisch und nur gering wasserlöslich sind.

Bislang wurde noch kein Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur vollständigen DCP-Transformation isoliert. Die oben genannten aerob DCP-transformierenden Bakterien sind lediglich in der Lage, eine unvollständige Dechlorierung zu vollziehen. Ein vollständiger Abbau von DCP zu Propen konnte bislang nur mit anaeroben aus Süßwassersedimenten angereicherten mikrobiellen Mischpopulationen erreicht werden (Löffler et al., 1997; Hauck und Hegemann, 1999). In diesen Anreicherungskulturen wurden Kombinationen aus sequentieller Dechlorierung und Dihaloelimination (Löffler et al., 1997) sowie aus sequentieller Dechlorierung und Dehydrodehalogenierung (Hauck und Hegemann, 1999) als DCP-Abbauewege nachgewiesen. Dies deutete auf ein Vorhandensein mehrerer DCP-umsetzender anaerober mikrobieller Spezies in den jeweiligen Mischkulturen hin.

Tab. 1.2 Beispiele für bakterielle Isolate mit der Fähigkeit zur respiratorischen Dechlorierung.

Isolat	Elektronenakzeptor	Referenz
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	CBT, PCE, PCP	Shelton und Tiedje, 1984
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	CP, PCE	Gerritse et al., 1996
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	CP	Christiansen und Ahring, 1996
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i>	CP	Sanford et al., 1996
<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	PCP	Bouchard et al., 1996
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	PCE, TCE	Neumann et al., 1994
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE, TCE	Holliger et al., 1998
<i>Dehalobacter sp. TEA</i>	PCE, TCE	Wild et al., 1996
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	PCE, TCE, DCE, VC	Maymó-Gatell et al., 1997
<i>Isolat CBDB1</i>	CB	Adrian et al., 2000

1.4 Technische Verfahren mikrobieller Dechlorierung

Zur mikrobiellen Dechlorierung chlororganischer Verbindungen in einem größeren Maßstab werden die abbauenden Mikroorganismen zumeist in Bioreaktoren, wie z.B. Festbett-, Wirbelschicht- oder Schlaufenreaktoren, kultiviert (Schlötterburg et al., 1999). In vielen Fällen liegt die Biomasse in immobilisierter Form vor, d.h. die Zellen werden an feste Trägermaterialien wie Aktivkohle, Sand, porösem Glas oder Ionenaustauscherharzen durch Adhäsion gebunden. Die Verwendung immobilisierter Mikroorganismen ermöglicht hohe Biomassedichten der transformierenden Organismen durch relativ große Aufwuchsflächen. Ein weiterer Vorteil besteht in der Entkopplung der Biomasseaufenthaltszeit von der hydraulischen Verweilzeit. Dies ermöglicht auch langsam wachsenden Organismen sich im Bioreaktor zu etablieren (Hamilton, 1987).

In den meisten Fällen werden undefinierte anaerobe Mischkulturen zur Dechlorierung chlororganischer Verbindungen in Bioreaktoren eingesetzt (z.B. Hauck und Hegemann, 1999; Stuart et al., 1998; Tartakovsky et al., 2000; Zou et al., 1999). Die Mitglieder dieser Konsortien bilden komplexe Biofilme auf den verwendeten Trägermaterialien aus und sind gegenüber Störungen des Abbauprozesses außerordentlich widerstandsfähig. So sind Biofilme mikrobieller Mischpopulationen gegenüber schwankenden Schadstoffkonzentrationen oder unregelmäßigen Abwasseranfallzeiten weitaus weniger anfällig als suspendierte Mikroorganismen (Hempel und Krull, 1996). Darüber hinaus sind mikrobielle Mischkulturen für eine Dechlorierung kontaminierter Abwässer besser geeignet als entsprechende Reinkulturen, da letztere nach einer längeren Betriebszeit des Bioreaktors durch autochthone Mikroorganismen verdrängt werden können (Massol-Deyá

et al., 1997; Jones et al., 1998). Der Einsatz von dechlorierenden Reinkulturen würde zudem aufwendigere Maßnahmen zum Erhalt der Prozeßsterilität erfordern und somit zu einer Kostensteigerung führen.

Obwohl die Verwendung mikrobieller Mischpopulationen zur Dechlorierung kontaminierter Abwässer in Bioreaktoren zu einer hohen Prozeßstabilität führt, kann es dennoch durch drastische Veränderungen der Betriebsparameter zu Störungen kommen. In solchen Fällen muß dem Geschehen durch eine geeignete Bioprozeßsteuerung entgegengewirkt werden. Da jedoch im überwiegenden Fall nur unzureichende Informationen zur mikrobiellen Zusammensetzung bzw. zum komplexen Stoffwechselgeschehen der verwendeten Mischkultur vorliegen, ist eine effiziente Steuerung des Reaktors erheblich erschwert. Diese Problematik kommt auch bei der generellen Optimierung des Abbauprozesses im Bioreaktor zum Tragen.

In der Literatur sind zwei anaerobe mikrobielle Konsortien beschrieben, die DCP reduktiv zu dechlorieren vermögen (Löffler et al., 1997; Hauck und Hegemann, 1999; siehe auch 1.3.2). Eine kontinuierliche Kultivierung in einem Bioreaktor wurde bislang nur mit der zweitgenannten Kultur durchgeführt. Die mikrobiologische Analyse dieser Bioreaktorkultur ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.5 Molekulare Analyse mikrobieller Diversität

Prokaryoten kommen in vielfältiger Form in nahezu allen Lebensräumen der Erde vor. Über einen Zeitraum von ca. 3.5 Milliarden Jahren haben sie sich an unterschiedlichste Umweltbedingungen, etwa durch die Entwicklung spezieller Stoffwechselwege oder genetischer Regulationsmechanismen, optimal angepaßt. Dieser langandauernde evolutionäre Prozeß führte zu einer außerordentlich hohen Diversität und Komplexizität vieler mikrobieller Lebensgemeinschaften, deren Analyse Gegenstand umfangreicher Forschungsaktivitäten ist (zur Übersicht s. Hunter-Cevera, 1998; Bull et al., 2000).

Die Untersuchung komplexer mikrobieller Populationen stellt methodisch in vielerlei Hinsicht eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Mikrobiologische Methoden, die ausschließlich auf herkömmlichen Kultur- und Identifizierungsverfahren beruhen, d.h. der Isolierung von Mikroorganismen aus einer Population mit anschließendem Nachweis physiologischer Eigenschaften mittels biologischer oder chemischer Testverfahren, haben sich in diesem Zusammenhang als nicht hinreichend erwiesen. Eine derartige Herangehensweise ermöglicht zwar eine weitreichende phäno- sowie genotypische Charakterisierung bzw. Identifizierung einzelner mikrobieller Spezies, führt jedoch in den meisten Fällen zu einer deutlichen Unterschätzung der tatsächlichen Diversität einer Population. So wurde anhand von DNA/DNA-Hybridisierungsexperimenten an Bodenproben eines norwegischen

Buchenwaldes die Anwesenheit von etwa 4000 genomisch vollständig differierenden Mikroorganismen ermittelt. Diese Zahl überstieg die der korrespondierenden Isolate um den Faktor 200 (Torsvik et al., 1990a; Torsvik et al., 1990b). Eine solche Diskrepanz kann auch beim Vergleich zwischen Direkt- und Lebendzellzahlbestimmungen einer mikrobiellen Population beobachtet werden. Ferner sind schon seit längerer Zeit zahlreiche Mikroorganismen bekannt, die zwar mikroskopisch dargestellt werden können, deren Isolierung aber bisher nicht gelang (Amann et al., 1995). Die Ursache für diese offensichtliche Schwäche kulturabhängiger mikrobiologischer Methoden ist u.a. darin zu sehen, daß der Großteil der beteiligten Mikroorganismen eines komplexen Lebensraums als Reaktion auf die vorherrschenden Umwelteinflüsse in sich stetig ändernde physiologische Zustände übergeht (Hattori et al., 1997). Darüber hinaus wird der physiologische Status eines Mikroorganismus¹ innerhalb einer Lebensgemeinschaft durch die Interaktion mit anderen Mikroorganismen maßgeblich beeinflußt. Diese Faktoren erschweren konsequenterweise die Isolierung der beteiligten Spezies auf künstlichen Nährmedien beträchtlich.

Eine andere Möglichkeit zur Analyse mikrobieller Diversität besteht in der Anwendung molekularer Nachweis- und Klassifizierungsmethoden. In diesem Fall werden Mikroorganismen anhand spezifischer Markermoleküle, wie z.B. ssRNA, lsRNA, Gyrasen, Elongationsfaktoren, ATPasen etc. identifiziert (Ludwig et al., 1998). Durch die vergleichende Analyse dieser Moleküle ist eine phylogenetische Einordnung der korrespondierenden Spezies möglich. Die ribosomale RNA spielt unter den phylogenetischen Markern eine herausragende Rolle. Aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer funktionellen Konstanz und ihrer Unterteilung in Sequenzdomänen mit variierenden Substitutionsraten stellt sie einen molekularen „Zeitmesser“ dar (Woese, 1987) (Abb. 1.4). Die in den vergangenen 10 – 15 Jahren durchgeführten Arbeiten zur vergleichenden rRNA-Analyse haben eine molekulare Systematik aller Lebewesen entstehen lassen. Demnach werden alle Organismen in die drei Hauptentwicklungslinien (Domänen) Bacteria, Archaea (die letzteren bilden zusammen die Prokaryoten) und Eucarya eingeteilt. Basierend auf der molekularen 16S rRNA-Systematik wurden die Bacteria 1987 durch 11 Phyla¹ charakterisiert (z.B. Proteobakterien, Spirochäten oder Cyanobakterien) (Woese, 1987). Etwa 10 Jahre später wurden bereits 36 Phyla beschrieben, von denen 13 noch ohne dazugehöriges Isolat waren (Phylum-Cluster; Abb. 1.5) (Hugenholtz et al., 1998b). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beträgt die Zahl der in Datenbanken hinterlegten 16S rRNA-Sequenzen etwa 22000 (Amann und Ludwig, 2000). Diese rasante Entwicklung der vergleichenden 16S rRNA-Analyse hat dazu geführt, daß die entsprechenden Sequenzinformationen mittlerweile einen wesentlichen Bestandteil

¹Ein 16S rRNA-basiertes Phylum stellt eine reproduzierbar monophyletische Gruppe aus mindestens zwei 16S rRNA-Sequenzen dar, die keine signifikante Ähnlichkeit zu einem anderen Phylum aufweist (Woese, 1987).

innerhalb eines polyphasischen Konzeptes der prokaryotischen Taxonomie darstellen. Bei diesem Spezieskonzept werden die gesamten verfügbaren phäno- sowie genotypischen Daten zur Erstellung einer generellen prokaryotischen Klassifizierung berücksichtigt (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Schlöter et al., 2000; Vandamme et al., 1996).

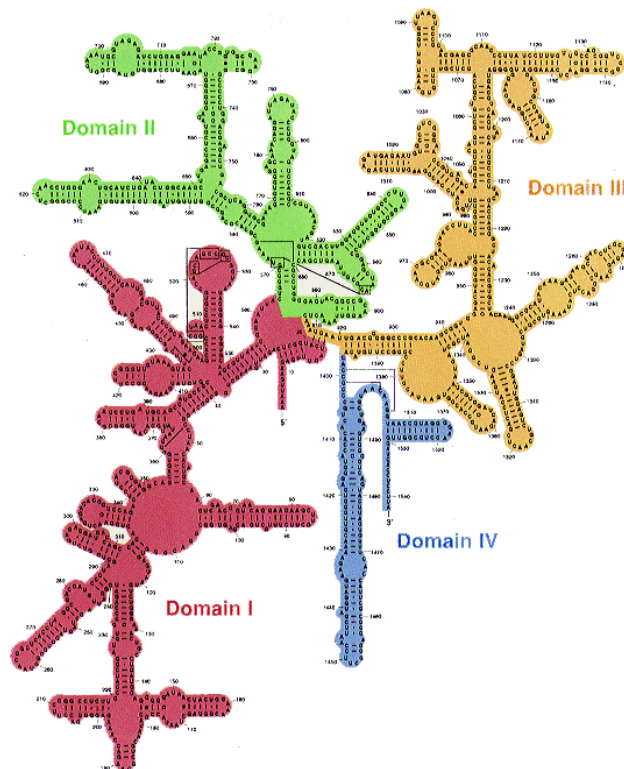


Abb. 1.4 Sekundärstruktur der 16S rRNA von *E. coli* (Garrett und Grisham, 1995).

Der Nachweis der 16S rRNA bzw. 16S rDNA bei Prokaryoten hat im Gegensatz zu herkömmlichen mikrobiologischen Identifizierungsverfahren den entscheidenden Vorteil, daß auch nicht-kultivierte Organismen eines Lebensraums erfaßt werden können. Dies hatte erhebliche Konsequenzen für die Erforschung komplex zusammengesetzter mikrobieller Habitate und führte zur Definition der sog. „molekularen Ökologie“ (Akkermans et al., 1994), die sich von der „mikrobiellen Ökologie“ durch ihr methodisches Spektrum abhebt (Hunter-Cevera, 1998). Die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die Entwicklung zahlreicher 16S rDNA-Amplifizierungs- und Sequenzierprimer sowie der Einsatz leistungsfähiger Methoden zur automatischen DNA-Sequenzierung (Weisburg et al., 1991; Ludwig et al., 1998) machte 16S rRNA bzw. 16S rDNA-gerichtete Methoden zu mikrobiologischen Standardtechniken.

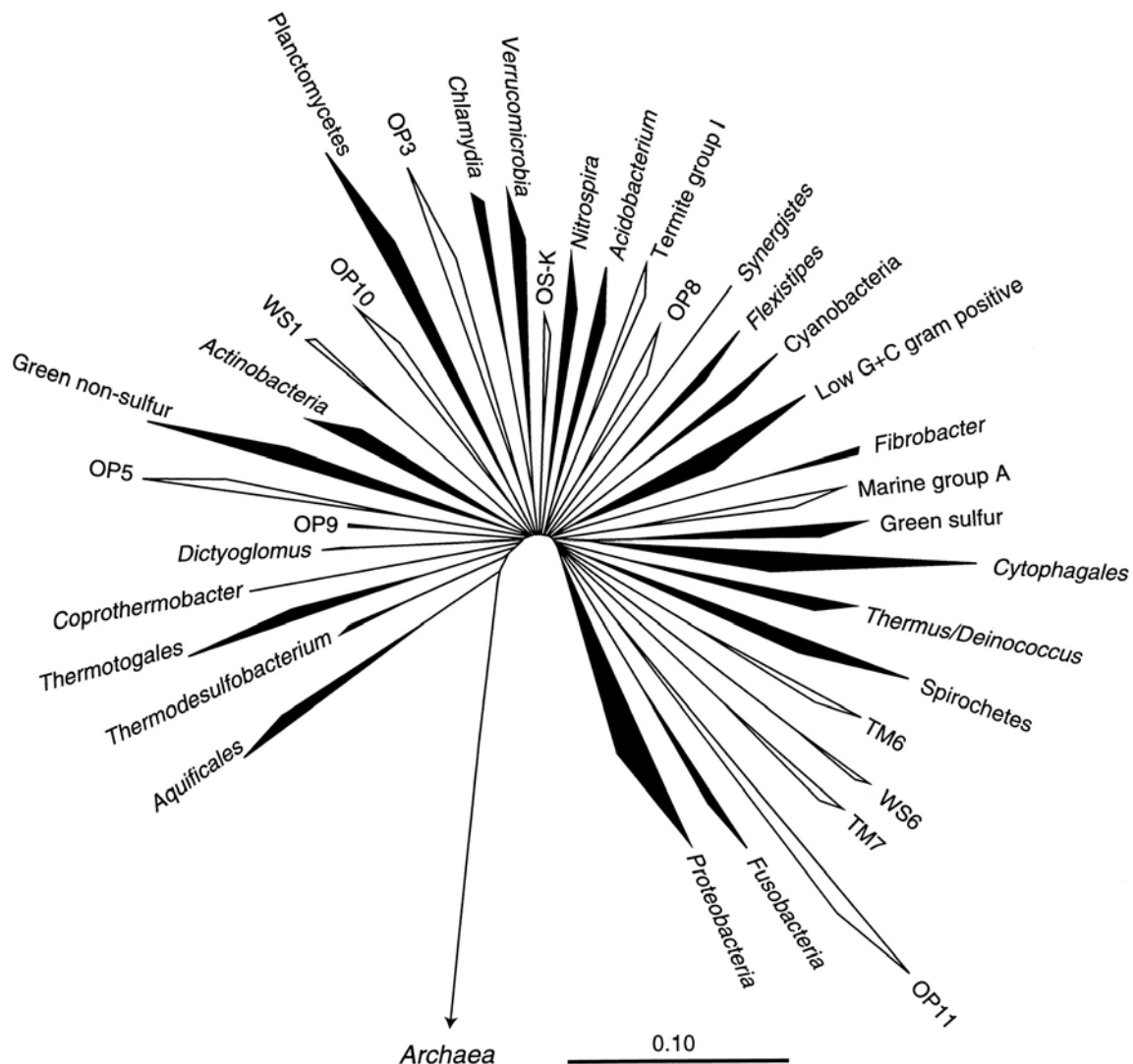


Abb. 1.5 Auf vergleichender 16S rDNA-Analyse basierender phylogenetischer Baum der bislang bekannten bakteriellen Phyla (schwarz) bzw. Phylum-Cluster (weiß) (Hugenholtz et al., 1998b).

Ausgangspunkt aller in vitro-Amplifikationsverfahren zur Analyse ribosomaler RNA ist die aus einer entsprechenden Probe präparierte genomische DNA. Aus ihr können die 16S rRNA-kodierenden Gene direkt amplifiziert und anschließend kloniert werden. Die durch das Sequenzieren des rDNA-Inserts eines rekombinanten Klon gewonnenen 16S rDNA-Sequenz wird mit anderen, bereits in Datenbanken hinterlegten 16S rDNA-Sequenzen durch Anwendung unterschiedlicher Algorithmen zur Ähnlichkeitsberechnung verglichen und phylogenetisch analysiert (zur Übersicht s. Ludwig et al., 1998). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine hohe Auflösung bei der Analyse komplexer mikrobieller Populationen. Allerdings ist das Durchmustern von 16S rDNA-Klonbibliotheken durch direktes Sequenzieren der rDNA-Inserts vergleichsweise arbeits- und zeitintensiv. Aus diesem Grunde wurden methodische Ergänzungen eingeführt, die durch das Auffinden

redundanter Klone eine Beschleunigung der Analyse herbeiführen. Dazu gehören etwa die Hybridisierung mit gruppen-spezifischen rDNA-Oligonukleotidsonden (Liesack und Stackebrandt, 1992), die Verwendung spezifischer rDNA-Polynukleotidsonden (von Wintzingerode et al., 1999) oder die Analyse rekombinanter Klone mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (Weidner et al., 1996) bzw. Terminalem-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (TRFLP) (Liu et al., 1997).

Im Gegensatz zu den oben genannten Methoden ist bei der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE; Muyzer et al., 1993) kein Klonierungsschritt erforderlich. Bei diesem Verfahren wird die aus genomischer DNA amplifizierte 16S rDNA in einem Polyacrylamidgel in Abhängigkeit ihres GC-Gehalts elektrophoretisch aufgetrennt. Die DGGE erlaubt damit eine schnelle, aber relativ grobe Erfassung mikrobieller Diversität und eignet sich hervorragend zur Untersuchung von Populationsveränderungen über einen längeren Zeitraum. Die Einführung der DGGE in der molekularen Ökologie hatte die verstärkte Anwendung und Adaption weiterer molekularer „Fingerprint“-Methoden zur Folge wie etwa der TGGE (Temperatur Gradienten Gelelektrophorese; Muyzer und Smalla, 1998), des Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) (Lee et al., 1996), der Amplifizierten-Ribosomalen-DNA-Restriktionsanalyse (ARDRA) (Massol-Deya et al., 1995) oder der Zufalls-Amplifizierten-Polymorphen-DNA (RAPD) (Xia et al., 1995). Ein wesentlicher Vorteil von DGGE, TGGE, SSCP sowie ARDRA besteht im Gegensatz zur RAPD darin, daß die 16S rDNA aus Gelbanden extrahiert und nach entsprechender Sequenzierung phylogenetisch analysiert werden kann. Die molekularen „Fingerprint“-Methoden sind relativ schnell und erlauben die Analyse vieler Proben in kurzer Zeit. Jedoch erreichen sie im Allgemeinen eine nur begrenzte Auflösung und erfassen lediglich die abundanten Mikroorganismen einer Population.

Neben der rein qualitativen Analyse mikrobieller Diversität ist eine molekulare Quantifizierung von Mikroorganismen zur Untersuchung von Populationsveränderungen von großer Wichtigkeit. DGGE sowie TGGE bieten die Möglichkeit der semi-quantitativen Abschätzung der aufgetrennten 16S rDNA und damit der korrespondierenden Organismen (Muyzer und Smalla, 1998). Eine genauere Methode stellt die quantitative PCR dar (z.B. Felske et al., 1998a). Bei diesem methodischen Ansatz kann durch die PCR-Amplifikation auf die Ausgangskonzentration eines jeweiligen 16S rDNA bzw. 16S rRNA-Templates rückgeschlossen und somit eine Quantifizierung der betreffenden Organismen vorgenommen werden.

Im Gegensatz zu den PCR-vermittelten Methoden ist die 16S rRNA-gerichtete In-Situ-Hybridisierung ein Verfahren zum direkten Nachweis von Mikroorganismen in fixiertem Probenmaterial unter Verwendung spezifischer Oligonukleotidsonden (DeLong et al., 1989). Die am häufigsten angewandte Methode ist die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH). Hier werden die Oligonukleotidsonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt,

der einen mikroskopischen Nachweis hybridisierter Zellen nach entsprechender Fluoreszenz-Anregung ermöglicht (zur Übersicht s. Moter und Göbel, 2000). Diese Methode erlaubt das mikroskopische „Auszählen“ hybridisierter Zellen und damit eine direkte Quantifizierung innerhalb der Probe (z.B. Cottrell und Kirchman, 2000; Manz et al., 1999; Ravensschlag et al., 2001).

So wie die herkömmlichen Kultur- und Identifizierungsverfahren unterliegen auch die molekularen PCR-vermittelten Nachweismethoden von Mikroorganismen spezifischen Limitierungen und Fehlermöglichkeiten (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997). Beispielsweise können PCR-Artefakte, wie etwa Sequenz-Chimären, unvollständige DNA-Präparationen aus dem Probenmaterial oder DNA-Kontaminationen zu einer Verfälschung einer molekularen Populationsanalyse führen. Jedoch haben die vielen 16S rRNA-gerichteten Untersuchungen zur Diversität mikrobieller Populationen unterschiedlichster Lebensräume übereinstimmend gezeigt, daß die natürliche Diversität der beteiligten Mikroorganismen bislang signifikant unterschätzt worden ist (zur Übersicht s. Hugenholtz et al., 1998b). Durch die phylogenetische Charakterisierung auch nicht-kultivierter Organismen ermöglicht die vergleichende 16S rRNA-Analyse die Erstellung eines Grundgerüsts, an dem sich weitere molekulare, aber auch kulturabhängige Verfahren orientieren können. Nur durch eine Kombination und konsequente Weiterentwicklung der klassischen mikrobiologischen sowie der molekularen Verfahren kann die außerordentlich komplexe mikrobielle Vielfalt der Biosphäre sinnvoll erforscht werden.

1.6 Ziel der Arbeit

DCP fällt hauptsächlich als Nebenprodukt chemischer Synthesen an und gilt als toxische Substanz mit krebserregendem Potential. Da DCP unter aeroben Bedingungen nur sehr schwer abbaubar ist, reichert es sich in Böden, Sedimenten und Grundwässern an und stellt somit eine ernstzunehmende Umweltkontaminante dar. Innerhalb des Sonderforschungsbereiches 193 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurde an der Technischen Universität Berlin (Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Arbeitsgruppe Prof. Hegemann) ein kontinuierliches Verfahren zur anaeroben Transformation von DCP in einem Wirbelschichtreaktor etabliert. Die Umsetzung des DCPs im Reaktor erfolgte durch eine anaerobe mikrobiellen Mischpopulation, die aus Flußsediment der Saale (bei Halle) angereichert worden war.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der mikrobiellen Diversität der anaeroben DCP-transformierenden Bioreaktorpopulation. Dazu sollte zunächst durch Anlage und Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken ein möglichst repräsentativer Querschnitt der prokaryotischen Diversität der Bioreaktorkultur gewonnen werden. Für diese Untersuchungen wurde der Bioreaktor nach Beendigung der Anfahrphase beprobt. Die durch die Analyse der Klonbibliotheken gewonnenen 16S rDNA-Sequenzen sollten durch Abgleich mit 16S rDNA-Datenbanken identifiziert bzw. eingeordnet werden. Im Anschluß sollte die phylogenetische Klassifizierung der in der Bioreaktorkultur vorkommenden Bakterien und Archaea erfolgen. Basierend auf den Sequenzinformationen sollten dann spezifische Oligonukleotidsonden und PCR-Primer für weitere molekulare Untersuchungen abgeleitet werden.

Es stellte einen wichtigen Aspekt der Untersuchungen dar, nicht nur eine Momentaufnahme der mikrobiellen Flora der Bioreaktorkultur zu erhalten, sondern eine mögliche Veränderung der Population in Abhängigkeit der Betriebsdauer des Reaktors bzw. der sich ändernden Prozeßparameter zu erfassen. Es sollten Mikroorganismen oder Mikroorganismengruppen gefunden werden, die als Indikatoren für den Verlauf der DCP-Transformation im Bioreaktor fungieren könnten. Darüber hinaus sollten anhand der nachgewiesenen Mikroorganismen auch Rückschlüsse zur Physiologie der DCP-Transformation im Bioreaktor gezogen werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, mußten unterschiedliche molekulare Methoden sinnvoll kombiniert werden, die neben der rein qualitativen Deskription mikrobieller Spezies auch deren Quantifizierung innerhalb der Population ermöglichen. Die Proben der DCP-transformierenden Bioreaktorpopulation sollten mit einer Kombination aus 16S rDNA-Klonbibliotheken, Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE), Quantitativer Echtzeit-PCR (QE-PCR) und Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) analysiert werden. Ziel dieses mehrdimensionalen Ansatzes war es, ein möglichst genaues Bild der DCP-umsetzenden Bioreaktorpopulation zu erstellen, das zum einen als Basis für weiterführende Untersuchungen zur mikrobiellen Transformation von chlororganischen Verbindungen und zum anderen der direkten Optimierung des Bioreaktorverfahrens dienen sollte.

1.7 Analyseschema

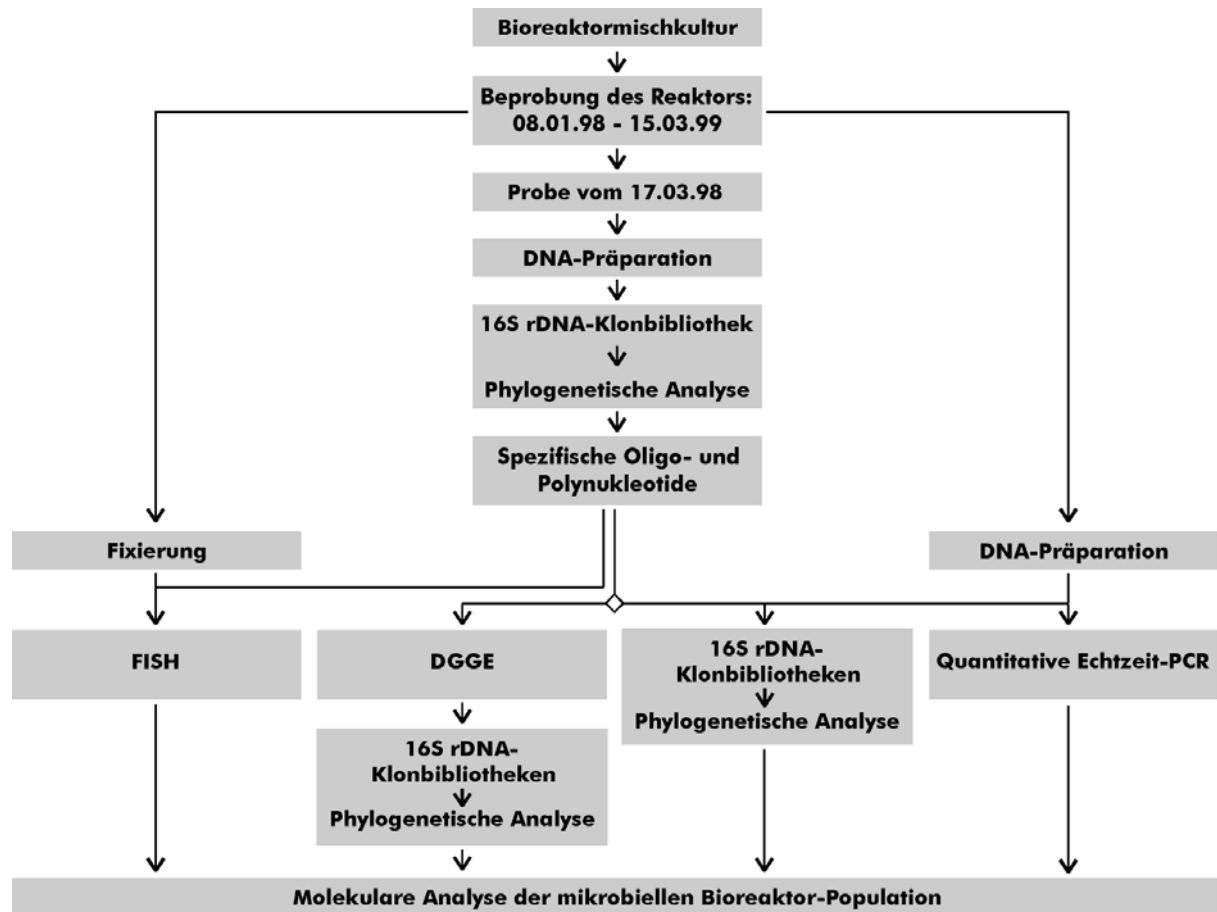


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der methodischen Vorgehensweise zur molekularen Analyse der DCP transformierenden Bioreaktorkultur.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tab. 2.1 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Hersteller.

Substanz	Hersteller
1,2-Dichlorpropan (DCP)	Merck, Darmstadt
Acetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	Inst. f. Mikrobiol. u. Hygiene, Berlin
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, München
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
CSPD (Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-Doxetan-3,2'(5'Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-Phenylphosphat)	Roche, Mannheim
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck-Schuchhardt, Hohenbrunn
Ecotainer Wasser	B. Braun, Melsungen
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Amresco, Solon, USA
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kobaltchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Kupferchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumjodid	Roth, Karlsruhe
Natriumlauroylsarkosin	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
Natriumselenat	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Merck, Darmstadt
Peressigsäure	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Phenol (Rotiphenol)	Roth, Karlsruhe
Rapid Gel XL (40%)	USB, Cleveland, USA
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Bio-Rad Laboratories, München
Silica	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff	Linde AG, Hamburg
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tricin (N-tris[Hydroxymethyl]methylglycin; N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(-Base) (Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit, USA
Wasserstoff	Linde AG, Hamburg
X-Gal (5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol FF	Bio-Rad Laboratories, München
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt

2.2 Puffer, Nährmedien und sonstige Lösungen

Tab. 2.2 Zusammenstellung der verwendeten Puffer, Nährmedien sowie sonstigen Lösungen.

Substanz	Zusammensetzung
Agarosegel-Probenpuffer	1.5 g Ficoll 25 mg Bromphenolblau 25 mg Xylencyanol FF ad 10 mL Aqua dest.
Anti DIG AP Konjugat	1% Blockierungsreagenz 9 mL Maleinsäurepuffer 2 µL Anti DIG AP (Anti Digoxigenin Alkalische Phosphatase)
Blockierungsreagenz	10% Blockierungsreagenz [Roche, Mannheim] in Maleinsäurepuffer
CSPD-Substrat	12 µL CSPD auf 10 mL Detektionspuffer
Detektionspuffer	0.1 M Tris-Salzsäure, pH 9.5 0.1 M Natriumchlorid
DIG PCR-Mix	10 µM DIG-11-dUTP 190 µM dTTP je 200 µM dATP, dCTP, dGTP
Hybridisierungspuffer (FISH)	0.9 M Natriumchlorid 0.02 M Tris-Salzsäure; pH 7.2 0.01% SDS 0 – 60% Formamid
LAXI-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid 15 g Agar Agar ad 1000 mL Aqua dest. Nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abkühlen 250 µL Ampicillin (200 mg/mL) 200 µL X-Gal 50 µL IPTG
LightCycler Reaktionsmix	Taq DNA Polymerase Reaktionspuffer dUTP, dATP, dCTP, dGTP SYBR Green I 10 mM Magnesiumchlorid
Lysozympuffer	100 mM Tris-Base 50 mM EDTA pH 8.0

Maleinsäurepuffer	0.1 M Maleinsäure 0.15 M Natriumchlorid pH 7.5
Mung Bean Nuklease Puffer (Stratagene, Heidelberg)	30 mM Natriumacetat, pH 5.0 50 mM Natriumchlorid 1 mM Zinkchlorid 5% Glycerin
PBS-Puffer	8 g Natriumchlorid 0.2 g Kaliumchlorid 1.44 g Natriumhydrogenphosphat ad 1000 mL Aqua dest. pH 7.4
PCR-Puffer (10 x)	100 mM Tris-Salzsäure, pH 8.3 500 mM Kaliumchlorid
Phosphatpuffer	23.14 g Kaliumdihydrogenphosphat 164.38 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 mL Aqua dest.
Polyacrylamidgel (für DNA-Sequenzierung)	21 g Harnstoff 5 mL Rapid Gel XL (40%) 6 mL 10 x TBE (für Sequenziergele) 500 µL DMSO ad 50 mL Aqua dest. (Filtration) 292 µL APS (10%) 30 µL TEMED
RAMM-Medium	<p>Lösung 1: 5.3 g Ammoniumchlorid 0.75 g Calciumchlorid-Dihydrat 1 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0.2 g Eisenchlorid ad 1000 mL Aqua dest.</p> <p>Lösung 2: 10.8 g Kaliumdihydrogenphosphat 14 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 mL Aqua dest.</p> <p>Lösung 3: 50 mg Manganchlorid-Tetrahydrat 5 mg Borsäure 5 mg Zinkchlorid 1 mg Kupferchlorid 1 mg Natriummolybdat-Dihydrat 50 mg Kobaltchlorid-Hexahydrat 1 mg Nickelchlorid 5 mg Natriumselenat ad 1000 mL Aqua dest.</p>

	Zur Herstellung des Mediums wurden 100 mL Lösung 1, 25 mL Lösung 2 und 10 mL Lösung 3 vereinigt, mit Aqua dest. auf 1000 mL aufgefüllt und autoklaviert.
SE-Puffer	8.76 g Natriumchlorid 2.92 g EDTA ad 1000 mL Aqua dest.
Silika-Suspension	2.5 g Silica 25 mL Natriumjodid (3 M)
Silika-Waschpuffer	50 mM Natriumchlorid 10 mM Tris-Base 2.5 mM EDTA 50% Ethanol pH 7.5
SSC-Puffer (20 x)	175.3 g Natriumchlorid 88.2 g Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 mL Aqua dest. pH 7.0
Standard-Hybridisierungspuffer	5 x SSC 0.1% Natriumlauroylsarkosin 0.02% SDS 1% Blockierungsreagenz
Standard-Hybridisierungspuffer mit Formamid	5 x SSC 0.1% Natriumlauroylsarkosin 0.02% SDS 2% Blockierungsreagenz 50% deionisiertes Formamid
Stopppuffer	9.5 mL Formamid 0.4 mL EDTA (500 mM) 5 mg Bromphenolblau 5 mg Xylencyanol FF 0.1 mL Aqua dest.
Stripping-Lösung	0.2 N Natronlauge 0.1% SDS
TAE-Puffer (50 x)	242 g Tris-Base 57.1 mL Essigsäure 100 mL EDTA (0.5 M) ad 1000 mL Aqua dest.

TBE-Puffer (10 x) (für Agarosegele)	108 g Tris-Base 27.5 g Borsäure 7.3 g EDTA ad 1000 mL Aqua dest.
TBE-Puffer (10 x) (für Sequenziergele)	162 g Tris-Base 27.5 g Borsäure 7.3 g EDTA ad 1000 mL Aqua dest.
TB-Medium	12 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 mL Glycerin (87%) ad 900 mL Aqua dest. Nach dem Autoklavieren wurden 100 mL Phosphat-Puffer zugesetzt.
TE-Puffer	0.01 M Tris-Salzsäure, pH 7.6 1 mM EDTA
Tricin-Puffer (10 x)	300 mM Tricin 500 mM Kaliumchlorid pH 8.4
TSS-Lösung	0.5 M Tris-Salzsäure, pH 8.0 0.1 M Natriumchlorid 10% SDS
Waschlösung 1	0.1 x SSC 0.1% SDS
Waschlösung 2	6 x SSC 0.1% SDS

2.3 Biochemikalien und Kits

Tab. 2.3 Verwendete Biochemikalien bzw. Kits sowie deren Hersteller.

Substanz / Kit	Hersteller
AdvanTage PCR Cloning Kit	Clontech, Heidelberg
AmpliTaq DNA-Polymerase	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTP)	Roche, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit (mit: Anti DIG AP, Blockierungsreagenz, CSPD)	Roche, Mannheim
DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit	Roche, Mannheim
DIG-11-dUTP	Roche, Mannheim

DNA-Marker II, -III, -XIV	Roche, Mannheim
GFX Plasmidpräparationskit	Pharmacia Biotech, Freiburg
LighCycler DNA Master SYBR Green I Kit (mit: LightCycler-Reaktionsmix)	Roche, Mannheim
Lysozym	Fluka, Neu-Ulm
Mung Bean Nuklease	Stratagene, Heidelberg
PlusOne DNA Silver Staining Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
TA-Cloning Kit	Invitrogen, de Shelp, Niederlande
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Roche, Mannheim
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	Roche, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat (dATP)	Roche, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat (dATP)	Roche, Mannheim
Thermosequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg

2.4 Oligonukleotide

Tab. 2.4 Verwendete Primer und Oligonukleotidsonden.

Oligonukleotid	Spezifität	Sequenz (5'→3')	Zielregion	Markierung
10-30Fa	<i>Archaea</i>	TCCGGTTGATCCTGCC	16S, 8-23	-
1114F	<i>Bacteria</i>	GCAACGAGCGCAACCC	16S, 1100-1115	IR
1390Ra	<i>Archaea</i>	CGGTGTGTGCAAGGAGC	16S, 1385-1401	-
357Fa	<i>Archaea</i>	ACGGGGCGCAGCAGGC	16S, 344-359	-
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S, 915-934	Cy3
deb1007r	<i>Dehalobacter</i>	ACTCCCATATCTCTACGG	16S, 989-1007	-
deb179	<i>Dehalobacter</i>	TGCCTCTCGGACAATACA	16S, 179-197	Cy3
deb179f	<i>Dehalobacter</i>	TGTATTGTCCGAGAGGCA	16S, 179-197	-
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Cy3
F-968	<i>Bacteria</i>	AACGCGAAGAACCTTAC	16S, 968-985	-
F-968-GC	<i>Bacteria</i>	(CGCCCGGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGG)AA CGCGAAGAACCTTAC	16S, 968-985	-
M13(21)F	M13-Bindungsstelle	TGTAACGACGGCCAGT	universell	IR
M13(24)R	M13-Bindungsstelle	AACAGCTATGACCATG	universell	-
M13(24)R	M13-Bindungsstelle	AACAGCTATGACCATG	universell	IR
M13(40)F	M13-Bindungsstelle	GTTTTCCAGTCCGAC	universell	-
MCONC	<i>Methanosaeta</i>	GAGTACGCTGGCAACTGT	16S, 1120-1135	Cy3
MHOLL	<i>Methanomethylovora hollandica</i>	AAGAGGTACTACGGGGT	16S, 668-686	Cy3

R-1401	<i>Bacteria</i>	CGGTGTGTACAAGGCC	16S, 1384-1401	-
RTU2	<i>Bacteria</i>	TGCCTCCCGTAGGAGTYTGG	16S, 334-353	-
RTU8	<i>Bacteria</i>	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	16S, 1522-1541	-
TPU1	<i>Bacteria</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S, 8-27	-
TPU1	<i>Bacteria</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S, 8-27	IR

2.5 Kontrollstämme

Tab. 2.5 Verwendete Kontrollstämme.

Stamm	Herkunft/Stammsammlung/ Nummer
<i>Escherichia coli</i> TOP10F	Invitrogen, de Shelp, Niederlande
<i>Dehalobacter restrictus</i>	DSMZ, DSM 9455
<i>Sulfospirillum barnesii</i>	DSMZ, DSM 10660
<i>Clostridium symbiosum</i>	DSMZ, DSM 934
<i>Methanoculleus olentangyi</i>	DSMZ, DSM 2772
<i>Methanosarcina barkeri</i>	DSMZ, DSM 800
<i>Methanosaeta concilii</i>	DSMZ, DSM 3671
<i>Methanosarcina mazei</i>	DSMZ, DSM 2053
<i>Methanosarcina thermophila</i>	DSMZ, DSM 1825

An Milchpulver bzw. Aktivkohle immobilisiertes Zellmaterial aus Stammkonserven wurde zunächst in je 1 mL sterilem PBS aufgenommen. Zellsuspensionen von Aktivkulturen wurden direkt weiterbehandelt. Die eine Hälfte einer jeweiligen Zellsuspension wurde für in-situ-Hybridisierungen durch Zugabe des gleichen Volumens Ethanol/PBS (1:1) fixiert. Aus der verbleibenden Hälfte wurde DNA mittels einer Schnellmethode präpariert. Dazu wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1 min, 13800 g) und die sedimentierten Zellen nach Dekantieren des Puffers im gleichen Volumen TE resuspendiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 95°C erhitzt und zur Abtrennung von Zelltrümmern kurz abzentrifugiert. Die so präparierte DNA (Zellysat) wurde bei -20°C gelagert und direkt für PCR-basierte Methoden eingesetzt.

2.6 Entnahme von Flußsedimentproben, Kultivierung der mikrobiellen Sedimentpopulation und Probenentnahme aus dem Bioreaktor

Im August 1997 wurde eine Probe aus dem Flußsediment der Saale entnommen. Der Probenentnahmeort befand sich zwischen Korbetha und Rattmannsdorf (bei Halle, Sachsen-Anhalt) direkt vor der Mündung eines Abwasserkanals einer Propylenoxid-produzierenden Fabrik (Abb. 2.1). Etwa 20 Liter Sediment-Flußwassergemisch wurden mit Hilfe einer speziellen Sedimententschaufel entnommen und auf direktem Wege ins Labor transportiert. Das Probenmaterial wurde in 1 L-Kulturflaschen gefüllt und anschließend mit Mineralsalzmedium (Shelton und Tiedje, 1984) überschichtet, dem zuvor 3 mg/L DCP sowie 50 mg/L Methanol zugesetzt worden waren.

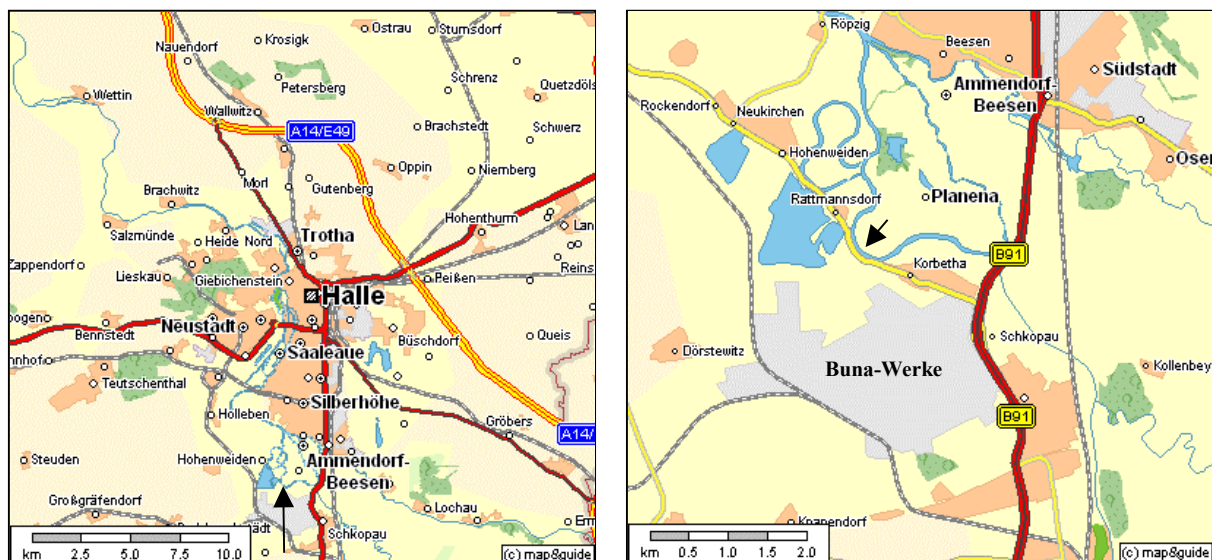


Abb. 2.1 Probenentnahmestelle an der Saale in der Nähe von Halle. Die Pfeile kennzeichnen den entsprechenden Flußabschnitt. Die hellgraue Fläche symbolisiert das Betriebsgelände des naheliegenden chemischen Industriestandorts (Buna-Werke).

Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte anaerob bei 30°C unter Lichtabschluß. Die Konzentration des DCPs in den Kulturflaschen wurde täglich mit einem Headspace-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (Sigma 2000, Perkin Elmer, Norwalk, USA) gemessen. Die DCP-Transformationsrate ließ sich wie folgt ermitteln: $\text{Transformation}_{(\text{DCP})} = 100 \cdot \frac{c(\text{DCP, Ablauf})}{c(\text{DCP, Zulauf})} [\%]$. Nachdem eine stabile mikrobielle Transformation des DCPs vorlag, wurde einer der Ansätze mit würfelförmigen Polyurethanschaumstoffpartikeln (Bayvitec C, Bayer AG, Leverkusen) zusammengebracht. Einhundert PU-Körper von je 1 cm³ Volumen wurden über einen Zeitraum von 74 Tagen mit dem Sediment der Kulturflasche inkubiert. Danach wurden die an den PU-

Körpern immobilisierten Mikroorganismen am 28.01.1998 in einen anaeroben kontinuierlich betriebenen 5 L-Wirbelschichtreaktor aus Edelstahl überführt (Abb. 2.2). Der Reaktor wurde mit Mineralsalzmedium gespeist (Shelton und Tiedje, 1984), dem zuvor 7 mg/L DCP sowie 50 mg/L Methanol zugesetzt worden waren. In den Kopfraum des Reaktors wurde eine mit Glasobjektträgern versehene Halterung aus Edelstahl eingebaut ("Robins-Device"). Der pH-Wert und das Redoxpotential wurden mittels in den Reaktordeckel eingebauter Elektroden kontinuierlich erfaßt und durch einen angeschlossenen Mikrocomputer dokumentiert. Die DCP-Konzentrationen im Zulauf sowie Ablauf des Reaktors wurden täglich bestimmt. Vor der ersten Probenahme wurde der Reaktor zwei Monate lang unter konstanten Bedingungen betrieben. In diesem Zeitraum betrug die DCP-Transformation etwa 98% bei einem Redoxpotential von -380 mV, einem pH-Wert von 6.8 und einer hydraulischen Verweilzeit von 24 Stunden.

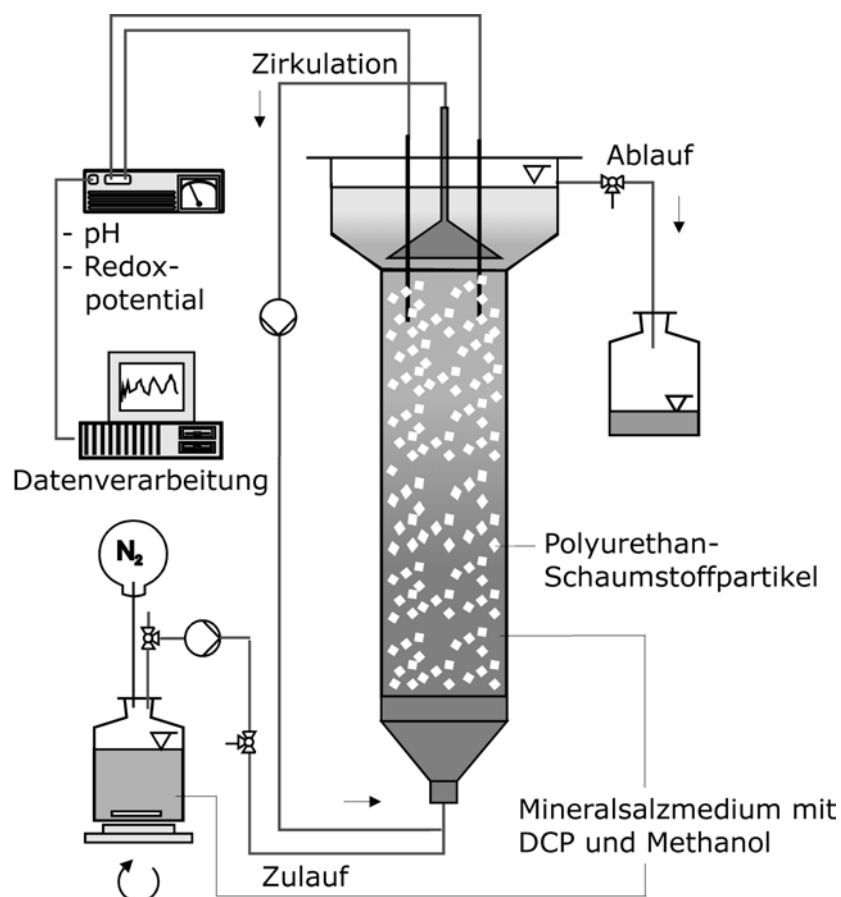


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des zur Kultivierung der DCP-transformierenden Mischkultur verwendeten Wirbelschichtreaktors.

Zur Probenentnahme (PU-Körper, Objektträger) wurde der Reaktordeckel kurzfristig entfernt und der Reaktorkopfraum kontinuierlich mit Stickstoff begast. Die Proben wurden zur Lagerung entweder direkt (für sich anschließende in-vitro-Amplifikationsverfahren) oder nach Überschichtung mit 50% Ethanol/PBS (für sich anschließende in-situ-Hybridisierungen) eingefroren. Während der Probennahme kam es aufgrund des Luftsauerstoffzutritts zu einer deutlichen Erhöhung des Redoxpotentials und damit zu einer Beeinträchtigung der DCP-Transformation. Die Reaktormischkultur hat sich jedoch nach Beendigung der Probennahme innerhalb kurzer Zeit wieder stabilisiert. Zwischen Tag 769 und 785 des Reaktorbetriebs wurden täglich zur gleichen Zeit 200 mL Wasserstoff in den Zulauf des Reaktors gegeben. Um hierbei eine mögliche Veränderung der DCP-Transformationsrate nachweisen zu können, wurde diese zuvor auf 45% gesenkt (Verminderung der Verweilzeit auf 20 Stunden sowie DCP-Konzentrationserhöhung von 45 mg/L im Zulauf). Die Kultivierung der DCP-transformierenden Mischkultur wurde im Rahmen der Kooperation innerhalb des Sonderforschungsbereichs 193 von Dr. Regine Hauck betreut (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hegemann, Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität Berlin).

2.7 Präparation der DNA aus den Bioreaktorproben

Pro Bioreaktorprobe wurde die DNA eines PU-Körpers präpariert (modifiziert nach Tsai und Olson, 1991). Dazu wurde der PU-Körper aufgetaut und in 3.5 mL SE sowie 2.5 mL Lysozympuffer aufgenommen. Nach Zugabe und vollständiger Lösung von 0.175 mg Lysozym wurde der PU-Körper 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert und anschließend in 6 mL TSS aufgenommen. Es folgten acht Einfrier- und Auftauzyklen des Probenmaterials durch sukzessives Eintauchen in flüssigen Stickstoff (jeweils 10 min), gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei 65°C im Wasserbad. Nach Zugabe von 215 µL Proteinase K-Lösung (15.3 mg/L) wurde das Probenmaterial bei 50°C für 2.5 Stunden inkubiert. Die anschließende lichtmikroskopische Untersuchung des Biofilms ergab, daß die Morphologie der Mikroorganismen nicht mehr erkennbar war. Daraufhin wurde die DNA jeweils einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform aus der Flüssigphase des Ansatzes extrahiert. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Zugabe von einem Volumenteil (VT) absoluten Ethanol sowie 0.1 VT Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 4.9) bei -80°C ü.N. gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13800 x g, 1 h, 4°C), das erhaltene DNA-Präzipitat einmal mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend in 100 µL TE gelöst (10 min, 50°C). Zur Abtrennung niedermolekularer DNA sowie möglicherweise vorhandener PCR-Inhibitoren wurde eine Gelfiltration sowie eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Liesack und Stackebrandt, 1992). Dazu wurde zunächst ein 50 µL-Aliquot der in TE-Puffer gelösten Bioreaktor-DNA mittels einer S-300

HR Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß Herstellerangaben gelfiltriert. Im Anschluß daran wurde die Probe mit 0.5 VT sterilem Agarosegel-Probenpuffer vermischt und mit einer zusätzlichen Negativkontrolle (nur steriler Probenpuffer) zur elektrophoretischen Trennung auf ein einprozentiges Agarosegel geladen. DNA-Banden mit einer Größe von mehr als 9 kb sowie der korrespondierende Bereich der Negativkontrolle wurden unter UV-Licht (356 nm) mit einem sterilem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um eine Kontamination des Probenmaterials mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden zuvor sämtliche Kunststoffteile der Elektrophoresekammer mit sterilem Wasser sowie einer frisch angesetzten zehnpromzentigen Peressigsäure-Lösung gespült und UV-bestrahlt. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden zuvor autoklaviert. Die in den ausgeschnittenen Gelstücken enthaltene Bioreaktor-DNA wurde mit Hilfe des QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers eluiert. Die Negativkontrolle wurde entsprechend behandelt.

2.8 Analyse der Bioreaktorproben anhand von 16S rDNA-Klonbibliotheken

2.8.1 PCR-Amplifikation der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben

Die PCR-Amplifikation der aufgereinigten Bioreaktor-16S rDNA erfolgte in 50 µL-Ansätzen mit Hilfe eines Trioblocks (Biometra, Göttingen). Bei der Amplifizierung bakterieller 16S rDNA setzte sich der PCR-Ansatz wie folgt zusammen: 2 µL Bioreaktor-DNA, 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM TPU1, 0.5 µM RTU8, je 200 µM dNTP, 2.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase, 2% (v/v) DMSO, 2.5 µg/µL BSA und 2 Tropfen Mineralöl. Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.6 dargestellt.

Tab. 2.6 PCR-Protokoll für *Bacteria*-spezifische 16S rDNA-Amplifikation.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	3 min	1x
Denaturierung	93°C	2 min	1x
Denaturierung	93°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	53°C	1 min	28x
Primer-Elongation	72°C	3 min	
Primer-Elongation	72°C	7 min	1x

Die Amplifikation archaealer 16S rDNA fand in folgendem Reaktionsansatz statt: 2 µL Bioreaktor-DNA, 1 x Tricin-Puffer (Barns et al., 1994), 5% Acetamid, 2 mM MgCl₂, je 0.5 µM 10-30Fa sowie 1390Ra bzw. je 0.5 µM 357Fa sowie 1390Ra, je 200 µM dNTP, 2.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase, 2% (v/v) DMSO, 2.5 µg/µL BSA und 2 Tropfen Mineralöl. Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7 PCR-Protokoll für *Archaea*-spezifische 16S rDNA-Amplifikation.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	6 min	1x
Denaturierung	92°C	1.5 min	
Primer-Hybridisierung	50°C	1.5 min	30x
Primer-Elongation	72°C	3 min	
Primer-Elongation	72°C	7 min	1x

Die DNA-Polymerase wurde während des Denaturierungsschritts separat in die Reaktionsgefäße pipettiert. Dieser "Hot-Start" erhöhte die Spezifität der Amplifikation durch Unterbindung der Polymeraseaktivität bei niedrigeren Temperaturen. In der Negativkontrolle wurde Wasser anstatt Template-DNA in den PCR-Ansatz gegeben. Als Positivkontrolle wurde *Escherichia coli*- bzw. *Methanosaeta barkeri*-Zelllysate verwendet.

2.8.2 Agarosegelelektrophorese der 16S rDNA-Amplifikate

Die qualitative Kontrolle der PCR erfolgte durch Auftrennung eines Gemisches aus je 5 µL Amplifikat und 3 µL Agarosegel-Probenpuffer in einem horizontalen einprozentigen Agarosegel. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde 1 µL Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) zu 100 mL heißer Agarose-Lösung gegeben. Als Längenmarker wurde DNA-Marker III verwendet. Die Trennung erfolgte bei 10 V/cm in 1 x TBE. Das Gel wurde anschließend mit dem Eagle Eye Videodokumentationssystem (Stratagene, Heidelberg) ausgewertet.

2.8.3 Klonierung der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben

Die 16S rDNA-Amplifikate der Bioreaktorproben wurden mit Hilfe des TA-Cloning Kits (Invitrogen, de Shelp) oder des AdvanTage PCR Cloning Kits (Clontech, Heidelberg) gemäß Herstellerangaben kloniert. Abweichend von den Empfehlungen wurden die zu klonierenden PCR-Produkte zunächst extrahiert und mit Hilfe des QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen (siehe 2.7). Diese Vorgehensweise führte zu einer effizienteren Transformation der bakteriellen 16S rDNA. Zur Klonierung wurden gemäß Herstellerempfehlung PCR-Produkte verwendet, die nicht älter als 24 Stunden waren. Die PCR-Produkte wurden in den Plasmid-Vektor

pCR2.1 (Invitrogen, de Shelp) bzw. in den identischen Vektor pT-Adv (Clontech, Heidelberg) ligiert. Die ligierten PCR-Produkte wurden in *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LAXI-Agar kultiviert (37°C, ü.N.) und im Anschluß einem "Blue-White-Screening" unterzogen. Nach einmaliger Überimpfung und Kultivierung weißer Kolonien auf frischem LAXI-Agar wurde eine Kontroll-PCR zur Ermittlung der Insertlängen rekombinanter Plasmide durchgeführt. Dazu wurden die Inserts mit Hilfe der zu den flankierenden Plasmidbereichen komplementären Primern M13(40)F und M13(24)R in einem Trioblock (Biometra, Göttingen) amplifiziert. Als Ausgangs-DNA diente das Zellysat zu prüfender weißer Kolonien. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher Koloniematerial in 100 µL sterilem TE-Puffer aufgenommen, für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend kurz anzentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg). Die PCR-Ansätze (25 µL) setzten sich zusammen aus jeweils 0.5 µL Zellysat einer weißen Kolonie, 1 x PCR-Puffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM M13(40)F, 0.5 µM M13(24)R, je 200 µM dNTP, 2.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase und einem Tropfen Mineralöl. Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.8 dargestellt.

Tab. 2.8 PCR-Protokoll für universelle (M13) 16S rDNA-Amplifikation.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	92°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	53°C	1 min	28x
Primer-Elongation	72°C	3 min	
Primer-Elongation	72°C	7 min	1x

In der Negativkontrolle wurde Wasser anstatt DNA in den PCR-Ansatz gegeben. Als Positivkontrolle diente *E. coli*-Zellysat eines Klon, dessen Plasmid-Insert sequenziert worden war. Die qualitative Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben.

2.8.4 Plasmidpräparation

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden je 1 mL TB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL) mit Koloniematerial eines Klon beimpft und bei 37°C ü.N. unter Schütteln bebrütet. Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des GFX Plasmid-Präparationskits (Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß den Angaben des Herstellers. Während der Aufreinigung wurde abweichend vom empfohlenen Protokoll die an der Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA einmal zusätzlich mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Zur Kontrolle wurden je 5 µL der isolierten Plasmid-DNA zusammen mit 3 µL Agarosegelprobenpuffer auf ein horizontales 0.8 prozentiges Agarosegel aufgetragen und

elektrophoretisch getrennt (siehe 2.8.2). Als Längenmarker wurde DNA Marker III verwendet. Nach Analyse des Gels unter UV-Licht konnte die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA abgeschätzt werden.

2.8.5 Analyse der 16S rDNA-Klonbibliotheken durch Sequenzierung

Bei ausreichender Konzentration wurde die präparierte Plasmid-DNA direkt zur Sequenzierung verwendet. Im Falle einer geringen Plasmid-Konzentration wurden die 16S rDNA-Inserts zunächst mit Hilfe der Primer M13(40)F und M13(24)R PCR-amplifiziert (50 µL-Ansätze, siehe 2.8.3). Als Template dienten jeweils 0.5 µL der jeweiligen Plasmid-Präparation. Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte unter Verwendung von Silika (Siliziumdioxid) aufgereinigt (Boyle und Lew, 1995). Dazu wurde die wässrige Phase des PCR-Ansatzes mit 2 VT einer 6 M Natriumjodidlösung sowie 12 µL einer Silika-Suspension vermischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Silikapartikel kurz abzentrifugiert und das erhaltene Pellet zweimal mit je 200 µL Silika-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 45 µL TE aufgenommen und die DNA 10 min bei 50°C eluiert. Die Silikapartikel wurden danach mittels Spin-Filtern (Bio101, Heidelberg) abgetrennt. Eine qualitative Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben, jedoch mit DNA Marker III. Nach Analyse des Gels unter UV-Licht konnte die jeweilige Konzentration der gereinigten PCR-Produkte abgeschätzt werden.

Zur DNA-Sequenzierung wurde die zyklische Methode mit fluoreszenzmarkierten Primern angewandt. Für die Analyse der 16S rDNA-Inserts kamen die universellen Sequenzierprimer M13(21)F und M13(24)R zum Einsatz sowie die bakterienspezifischen Primer TPU1 und 1114F. Alle Reaktionen wurden mit dem Thermosequense Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (8 µL) enthielt 3 - 5 µL aufgereinigtes PCR-Produkt bzw. aufgereinigte Plasmid-DNA, 4 pmol fluoreszenzmarkierten Primer, 1.5 % DMSO, 1 - 2 µL A-, C-, G- oder T-Reagenz sowie einen Tropfen Mineralöl. Die Sequenzierreaktionen wurden entweder mit dem Omni-Cycler (Hybaid, Heidelberg) oder mit dem Trioblock (Biometra, Göttingen) nach dem in Tab. 2.9 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tab. 2.9 Amplifikationsprotokoll der 16S rDNA-Sequenzierreaktionen.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	0.5 min	
Primer-Hybridisierung	55-58°C	0.5 min	28x
Primer-Elongation	70°C	1 min	

Entgegen den Herstellerangaben wurden zu den Sequenzieransätzen unmittelbar nach Ablauf der Reaktion je 6 µL formamidhaltiger Stoppuffer gegeben und ein Aliquot der Ansätze (1.7 – 2 µL) auf ein vierprozentiges senkrechtes Polyacrylamidgel (Länge: 66 cm; Stärke: 0.25 mm) aufgetragen. Die Analyse der Sequenzierprodukte erfolgte auf einem automatischen LI-COR 4000L DNA-Sequenzierer (MWG-Biotech, Ebersberg) mit der dazugehörigen Auswertesoftware (BaseImageIR v2.20, MWG-Biotech, Ebersberg).

2.8.6 Phylogenetische Analyse der 16S rDNA Sequenzen

Zunächst wurden die ermittelten 16S rDNA-Sequenzen mit den in öffentlichen Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen (Stand: Januar 2001), um eine orientierende phylogenetische Zuordnung zu erhalten. Dazu wurden die Anwendungen FASTA oder BLASTN2 des HUSAR Programm-Pakets (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Heidelberg, <http://genius.embnnet.dkfz-heidelberg.de/menu/cgi.bin/w2h/w2h.start>) verwendet. Das Alignment der 16S rDNA-Sequenzen sowie die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen erfolgte mit Hilfe des UNIX-basierten ARB Programm-Pakets (Technische Universität München, München, <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/ARB.ps>). Die lokale ARB-Sequenzdatenbank wurde mit den durch FASTA bzw. BLASTN2 ermittelten Sequenzen stetig aktualisiert. Zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen wurde die "Neighbor joining" (Saitou und Nei, 1987) mit einer Korrektur nach Jukes und Cantor (1969) sowie einer Bootstrap-Analyse (Felsenstein, 1985) angewandt. Um Fehler durch ungleich lange Sequenzen zu minimieren, wurden die Dendogramme z.T. mit Hilfe entsprechender Konsensusmasken erzeugt. Die Stammbäume wurden zusätzlich mittels der PHYLIP-PARSIMONY-Methode (Ludwig et al., 1998) berechnet, um die Reproduzierbarkeit der Verzweigungsmuster zu überprüfen. Um möglicherweise auftretende Sequenzchimären zu identifizieren, wurden alle Sequenzen mit dem CHECK-CHIMERA-Programm geprüft (Larsen et al., 1993).

2.8.7 Analyse der bakteriellen 16S rDNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit Polynukleotidsonden

Neben direkter Sequenzierung der 16S rDNA-Inserts ausgewählter Klone wurden die bakteriellen Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Polynukleotidsonden durchgemustert (von Wintzingerode et al., 1999). Dazu wurde die präparierte Plasmid-DNA (siehe 2.8.4) zunächst für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend in Eis abgekühlt. Je 1 µL der denaturierten DNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) pipettiert. Die Membran wurde von beiden Seiten auf einem UV-crosslinker (Modell TFL20M, MWG Biotech, Ebersberg) je 3 min mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) bestrahlt, so daß die DNA durch UV-Quervernetzung auf der Membran fixiert wurde.

Zur Herstellung der Polynukleotidsonden wurden zunächst 0.5 µL Plasmid-DNA eines entsprechenden Klons oder aber 1 µL Zellysat eines Referenzstamms unter Verwendung der Primer M13(40)F und M13(24)R PCR-amplifiziert (vgl. 2.8.5). Aliquots dieser PCR-Reaktionen wurden 1:1000 in TE verdünnt und dienten als Ausgangs-DNA für eine zweite nachgeschaltete Amplifikation mit den Primern TPU1 und RTU2. Dieser "nested PCR"-Ansatz sollte eine mögliche Koamplifizierung kontaminierender *E. coli*-16S rDNA verhindern. Darüber hinaus wurde dem zweiten Ansatz DIG-11-dUTP zugesetzt. Die TPU1/RTU2-Amplifikation erfolgte in 25 µL-Ansätzen in einem Trioblock (Biometra, Göttingen). Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1 µL M13-PCR-Produkt (1:1000 in TE), 1 x PCR-Puffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 µM TPU1, 0.5 µM RTU2, 7.5 µL DIG PCR-Mix, 2.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase und 1 Tropfen Mineralöl. Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.10 dargestellt.

Tab. 2.10 PCR-Protokoll zur Herstellung DIG-markierter 16S rDNA-Polynukleotidsonden.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	92°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	60°C	1 min	28x
Primer-Elongation	72°C	1 min	
Primer-Elongation	72°C	5 min	1x

In der Negativkontrolle wurde Wasser anstatt DNA in den PCR-Ansatz gegeben. Als Positivkontrolle wurde *E. coli*-Zellysat verwendet. Die qualitative Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben, jedoch mit DNA Marker XIV.

Zur nachfolgenden Hybridisierung wurden je 3 - 3.5 µL der DIG-markierten Polynukleotidsonden in 20 mL Standard-Hybridisierungspuffer mit Formamid gegeben und 10 min bei 68°C denaturiert. Zuvor wurden die Nylonmembranen 30 min bei 60°C in 40 mL Standard-Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die anschließende Hybridisierung der Membran mit den DIG-markierten Polynukleotiden erfolgte 4 Stunden bei Temperaturen zwischen 60 und 62°C. Alle Hybridisierungen wurden in Hybridisierungsglasröhren (200 mL) und in einem Hybridisierungsofen der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Nach Abgießen des Standard-Hybridisierungspuffers mit Formamid wurden die Membranen zweimal mit je 40 mL Waschlösung 1 bei 68°C jeweils 25 min gewaschen.

Der Nachweis der gebundenen DIG-markierten Polynukleotide erfolgte mit Hilfe des DIG Luminescence Detection Kit (Böhringer, Mannheim) bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die Membranen für 3 min mit Maleinsäure-Puffer gespült. Es folgte eine jeweils

30 minütige Inkubation in einprozentiger Blockierungslösung und anschließend in Anti-DIG-AP-Konjugat. Die Membranen wurden zweimal für je 15 min in Maleinsäurepuffer gespült und 3 min in Detektionspuffer äquilibriert. Danach wurden die Membranen für 5 min in CSPD-Substrat inkubiert, getrocknet und in einer Röntgenfilmkassette (MS-Laborgeräte, Heidelberg) auf einen Röntgenfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gelegt. Nach einer Belichtung von zunächst 15 min bei 37°C und anschließend 1 h bei Raumtemperatur wurde der Röntgenfilm mit Hilfe eines Hyperprozessors (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entwickelt. Um eine erneute Hybridisierung der Membranen zu ermöglichen, wurden gebundene Oligonukleotide durch Waschen mit Stripping-Lösung (2 x 30 min bei 37°C) entfernt.

2.8.8 Analyse der Archaea-16S rDNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Analog zur bereits beschriebenen Vorgehensweise bei den bakteriellen Klonbibliotheken (siehe 2.8.7) wurde zum Durchmustern der Archaea-Klonbibliotheken die Plasmid-DNA der betreffenden 16S rDNA-Klone mit Hilfe des GMX Plasmid Präparationskits präpariert und anschließend auf positiv geladenen Nylon-Membranen immobilisiert. Für die nachfolgende Dot Blot Hybridisierung der Membranen wurden die entsprechenden Oligonukleotide durch Verwendung des DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kits (Roche, Mannheim) gemäß Angaben des Herstellers enzymatisch (Terminale Transferase) mit Digoxigenin markiert. Für jede Reaktion wurden 100 pmol Oligonukleotid eingesetzt. Zur Überprüfung der Markierungsausbeute wurden Verdünnungsreihen des Eduktes und eines DIG-markierten Standards (Roche, Mannheim) verglichen. Dies erfolgte durch die Dot-Blot-Hybridisierung einer Test-Membran mit anschließender Detektion der Chemilumineszenz. Zur Dot-Blot-Hybridisierung der Proben-Membranen wurden je 10 pmol der DIG-markierten Oligonukleotidsonden in 20 mL Standard-Hybridisierungspuffer gegeben und die Membranen 2 Stunden bei 37°C hybridisiert. Zuvor wurde eine Vorhybridisierung in 40 mL Standard-Hybridisierungspuffer durchgeführt (30 min bei 60°C). Für alle Hybridisierungen wurden Hybridisierungsglasröhren (200 mL) sowie ein Hybridisierungsofen der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet. Nach Abgießen des Standard-Hybridisierungspuffers wurden die Membranen zweimal mit je 25 mL Waschlösung 2 je 15 min bei 52-54°C gewaschen. Der Nachweis der gebundenen DIG-markierten Polynukleotide erfolgte mit Hilfe des DIG Luminescence Detection Kit (Böhringer, Mannheim) wie unter 2.8.7 beschrieben.

2.9 Analyse der Bioreaktorproben mittels Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE)

2.9.1 Amplifikation und Trennung der 16S rDNA aus den Bioreaktorproben

Die Amplifikation und anschließende Auftrennung der Bioreaktor-16S rDNA in der DGGE wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Bodenökologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (Neuherberg, Bayern) von Claudia von Wintzingerode durchgeführt. Dazu wurde aus der aufgereinigten Bioreaktor-DNA (siehe 2.7) ein 435 bp langes 16S rDNA-Fragment unter Verwendung der Primer F-968-GC sowie R-1401 (Engelen et al., 1998) PCR-amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte in 50 µL-Ansätzen der folgenden Zusammensetzung: 2 µL Template-DNA, 1 x PCR-Puffer, 3 mM MgCl₂, je 0.2 µM Primer, 100 µM dNTP, 5 U AmpliTaq DNA-Polymerase und 1 Tropfen Mineralöl. Um unspezifische Amplifikation zu minimieren, wurde die Taq-Polymerase während der Denaturierung zugegeben (Hot-Start). Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.11 dargestellt.

Tab. 2.11 PCR-Protokoll für die DGGE.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1x
Denaturierung	93°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	54°C	1 min	28x
Primer-Elongation	72°C	1 min	
Primer-Elongation	72°C	10 min	1x

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Einzelstrang-DNA wurde durch einen Mung Bean Nuklease-Verdau entfernt (Simpson et al., 1999). Das Reaktionsgemisch (30 µL-Ansatz) enthielt 15 µL PCR-Produkt, 1x Mung Bean Nuklease Puffer sowie 3 U Mung Bean Nuklease und wurde 10 min bei 37°C inkubiert.

Für die DGGE der PCR-Produkte wurde das D-Gene System (Biorad, München) verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem sechsprozentigen Polyacrylamidgel bei einer Temperatur von 60°C und einer Spannung von 70 V innerhalb von 18 Stunden aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend gemäß Herstellerempfehlung silbergefärbt (PlusOne DNA Silver Staining Kit, Amersham-Pharmacia, Freiburg), luftgetrocknet, in Folie eingeschweißt und gescant. Die Auswertung des digitalen Gelabbildes erfolgte mit Hilfe der RFLPscan Plus Software (Version 3.0, Scanalytics, Fairfax, USA). Ermittelt wurden die relative Abundanz einer jeweiligen DGGE-Bande (rA), die Anzahl der

distinkten Banden einer Probe (S; Dunbar et al., 2000) sowie die Ähnlichkeit der Bandenmuster einzelner Proben untereinander in Form des Sorenson Index, CS, mit: $CS = 2j / (a+b)$, wobei a der Anzahl der Banden in Spur 1, b der Anzahl der Banden in Spur 2 und j der Anzahl der Banden in beiden Spuren entspricht.

2.9.2 Analyse der 16S rDNA-Fragmente ausgewählter DGGE-Banden

Basierend auf der digitalen Auswertung wurden ausgewählte DGGE-Banden einer 16S rDNA-Sequenzanalyse unterzogen. Dazu wurden die betreffenden Banden zunächst mittels eines sterilen Skalpells ausgeschnitten, in sterilem Wasser eluiert (50°C, 10 min) und anschließend mit den Primern F-968 und R-1401 (Engelen et al., 1998) reamplifiziert. Mit Ausnahme einer höheren Annealingtemperatur von 60°C entsprach das Reaktionsprotokoll dem unter 2.9.1 beschriebenen. Die Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben, jedoch unter Verwendung von DNA Marker XIV. Die 16S rDNA-Reamplifikate wurden mit Hilfe des TA-Cloning Kits (Invitrogen, de Shelp) kloniert (siehe 2.8.3). Die Plasmid-DNA ausgewählter Klone wurde präpariert (siehe 2.8.4) und direkt zur Sequenzierung verwendet. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der Primer M13(21)F und M13(24)R (siehe 2.8.5). Die Sequenzauswertung wurde analog zu 2.8.6 durchgeführt.

2.10 Analyse der Bioreaktorproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Die QE-PCR wurde mit Hilfe des LightCyclers (Roche, Mannheim) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technologie kann die Zunahme der Amplifikationsprodukte während einer PCR-Reaktion durch Detektion von Fluoreszenzenergie verfolgt werden. Im vorliegenden Protokoll wurde dem PCR-Reaktionsmix SYBR Green I zugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet selektiv an doppelsträngige DNA und emittiert bei entsprechender Anregung Fluoreszenzenergie, die das optische System des LightCyclers erfaßt. Auf diese Weise kann die Kinetik der Produktzunahme und damit die Ausgangskonzentration des Templates ermittelt werden.

Die PCR-Amplifikation der aufgereinigten Bioreaktor-DNA (siehe 2.7) erfolgte in 20 µL-Ansätzen unter Verwendung des LightCycler-DNA Master SYBR Green I Kits (Roche, Mannheim). Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 1 µL Template-DNA, 2 µL Reaktionsmix, 1% DMSO, zusätzlichen 1.3 mM MgCl₂, zusätzliche 0.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase sowie jeweils 0.5 µM Primer (TPU1 und RTU8 bzw. deb 179f und deb1007r). Die Reaktionen fanden in Kunststoffkapillaren mit geeigneten optischen Eigenschaften statt. Das PCR-Reaktionsprotokoll ist in Tab. 2.12 dargestellt.

Tab. 2.12 Amplifikationsprotokoll der QE-PCR.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	3 min	1x
Denaturierung	93°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	53°C	1 min	28x
Primer-Elongation	72°C	3 min	
Primer-Elongation	72°C	7 min	1x

Bei der Amplifizierung mit den Primern TPU1 bzw. RTU8 wurde *E. coli*-Zellysate als Positivkontrolle verwendet. Bei der Amplifizierung mit den Primern deb179f bzw. deb1007r wurde *Dehalobacter restrictus*-Zellysate als Positivkontrolle sowie Zellysate von *Sulfospirillum barnesii*- (eine Fehlbase) und *Clostridium symbiosum*- (zwei Fehlbasen) als Negativkontrollen verwendet. In beiden PCR-Ansätzen wurde in der Reagenzkontrolle Wasser anstatt DNA gegeben. Um die Konzentration des Templates in einer jeweiligen Probe ermitteln zu können, wurden während der PCR Verdünnungsreihen definierter DNA-Konzentration mitgeführt. Zu diesem Zweck wurde Plasmid-DNA des *Dehalobacter*-ähnlichen Klons SHA-67 (Primer deb179f / deb1007r) sowie des bakteriellen Klons SHA-116 (Primer TPU1 / RTU8) verwendet. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde durch Bestimmung der Licht-Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Ultrospec III Photometers (Pharmacia, Freiburg) bestimmt (Sambrook et al., 1989). Da 50 µg/mL doppelsträngige DNA eine Absorption (260 nm) von etwa 1 aufweist, konnten die Konzentrationen der Plasmid-DNAs von Klon SHA-67 sowie SHA-116 gemäß dieses empirischen Zusammenhangs ermittelt werden. Die Plasmid-DNAs beider Klone wurde in Zehnerschritten von 10^{-1} bis 10^{-6} verdünnt und als Template eingesetzt. Die PCR wurde mit einer Temperaturänderungsrate von 1°C/sec durchgeführt. Am Ende einer jeden Primerextension wurden die Fluoreszenzemissionen des an doppelsträngiger DNA gebundenen SYBR Greens I gemessen. Im Anschluß an die PCR wurden die Meßergebnisse mittels "Fit Points"-Methode analysiert (LightCycler-Software, Version 3; Roche, Mannheim). Die Basislinie wurde arithmetisch korrigiert, die Anzahl der Näherungspunkte betrug zwei. Zur Kontrolle wurde das PCR-Produkt analog zu 2.8.2 mit DNA-Marker XIV in einem einprozentigen Agarosegel aufgetrennt.

2.11 Analyse der Bioreaktorproben durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

2.11.1 Fixierung und Vorbehandlung des Zellmaterials

Die entnommenen Proben wurden durch Überschichtung mit einem Ethanol/PBS-Gemisch (1:1) fixiert und bei -20°C gelagert. Parallel dazu wurden alle Proben zusätzlich mit einem Ethanol/PBS-Gemisch (1:1) überschichtet, dem zuvor 1% (v/v) Formaldehyd (37%) zugesetzt worden war. Fixierte Mikroorganismen aus Reinkulturen wurden direkt für die FISH eingesetzt, während Proben aus Misch- bzw. Sedimentkulturen einer Vorbehandlung unterzogen wurden (Zarda et al., 1997). Dazu wurde jeweils ein PU-Würfel mit einem sterilen Skalpell in kleinst-mögliche Teile (ca. 2 mm^2) zerschnitten. Eines davon wurde mit $20\text{ }\mu\text{L}$ der Biomasse-haltigen Fixationslösung überschichtet, mit $980\text{ }\mu\text{L}$ Natriumpyrophosphat-Lösung aufgefüllt und für 5 sec ultrabeschallt (Energienstufe: MS72/D, Puls: 20%, Gerät: Sonoplus GM70, Bandelin, Berlin). Das auf diese Weise vorbehandelte Probenmaterial wurde am selben Tag verwendet, da das Natriumpyrophosphat zur Lyse der Zellen führte.

2.11.2 Hybridisierung der Mikroorganismen mit spezifischen Fluoreszenz-farbstoff-markierten Oligonukleotiden und Färbung mit DAPI

Die Hybridisierungen wurden auf Glasobjektträgern (Marienfeld, Bad Mergentheim) durchgeführt, die über je 6 kreisförmige Kompartimente (Durchmesser = 8 mm) verfügten. Nach Reinigung der Objektträger mit Ethanol wurden pro Kompartiment $10\text{ }\mu\text{L}$ Zellsuspension aufgetragen. Die Objektträger wurden bei 37°C bis zur völligen Eintrocknung des Zellmaterials inkubiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min in 50, 80 und 96 prozentigem Ethanol) entwässert. Danach wurden je 10 pmol einer fluoreszenzmarkierten Sonde in $10\text{ }\mu\text{L}$ Hybridisierungspuffer pro Kompartiment zugesetzt und die Objektträger in einer feuchten Kammer bei $46 - 48^{\circ}\text{C}$ zwischen 2 und 3 Stunden bei Lichtabschluß hybridisiert. Durch Variation der Hybridisierungstemperatur sowie der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer wurde die Stringenz der FISH eingestellt. Objektträger, feuchte Kammer sowie Hybridisierungspuffer wurden auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmt. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger kurz mit Wasser gespült, luftgetrocknet und mit "Mountingfluid" (Citifluor Ltd., London, UK) eingedeckt.

2.11.3 Mikroskopischer Nachweis

Der Nachweis fluoreszenzmarkierter Zellen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit einem Axioskop Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) unter Verwendung der Filtersätze F41-001, F41-007 (beide AHF Analysentechnik, Tübingen) sowie 02 G 365 (Zeiss, Göttingen). Bei 1000-facher Vergrößerung wurden Phasenkontrast- bzw. Epifluoreszenzbilder der Präparate erstellt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer am Mikroskop installierten Kamera (Zeiss, Göttingen) auf Kodak Ektachrome HC-400 Dia-Film (Kodak, Hamburg). Die Belichtungszeiten variierten zwischen 0.25 und 60 sec.

3 Ergebnisse

3.1 Probenentnahme aus dem Bioreaktor

Insgesamt wurden aus der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation sechs Proben entnommen (Polyurethanschaumstoffwürfel und Glasobjektträger). In diesem Zeitraum (08.01.1998 bis 25.10.2000) wurde die DCP-Konzentration im Zulauf des Reaktors variiert. Die Entnahmezeitpunkte sowie die gemessenen DCP-Konzentrationen im Reaktorzulauf sind in Tab. 3.1 zusammengefaßt. Probe S1 wurde aus der DCP-dechlorierenden Sedimentkultur entnommen, die als Inokulum des Reaktors verwendet wurde. Die Probe wurde unmittelbar vor der Beschickung des Bioreaktors genommen.

Tab. 3.1 Übersicht über die entnommenen Bioreaktorproben und korrespondierenden DCP-Konzentrationen. Von den Proben S2 - S6 wurden sowohl PU-Würfel als auch Glasobjektträger entnommen (Probe S1 nur PU-Würfel).

Zeitpunkt der Probennahme	Probenbezeichnung	DCP-Konzentration (Zulauf) [mg/L]
08.01.98	S1	0.05
17.03.98	S2	8.92
06.11.98	S3	68.00
15.03.99	S4	29.37
24.01.00	S5	22.45
25.10.00	S6	34.53

3.2 DNA-Extraktion aus den Bioreaktorproben

Die Gesamt-DNA der Proben S1 – S4 wurde durch eine Kombination aus Lysozym-, Proteinase K- sowie Frier/Tau-Behandlung extrahiert und anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Behandlung aufgereinigt. Trotz dieses ersten Aufreinigungsschritts wies die wässrige DNA-Lösung aller vier Proben eine stark bräunliche Färbung auf, die auf die Anwesenheit von PCR-inhibierenden Huminsäuren schließen ließ. Die Konzentration verunreinigender Substanzen wurde durch den zweiten Aufreinigungsschritt, der Gelfiltration, deutlich verringert. Trotzdem zeigten die DNA-Extrakte im Agarosegel neben der dominierenden hochmolekularen DNA-Bande immer

noch eine Vielzahl an niedermolekularen Degradationsprodukten (Abb. 3.1), die erst durch einen dritten Aufreinigungsschritt, der präparativen Agarosegelelektrophorese, entfernt werden konnten.

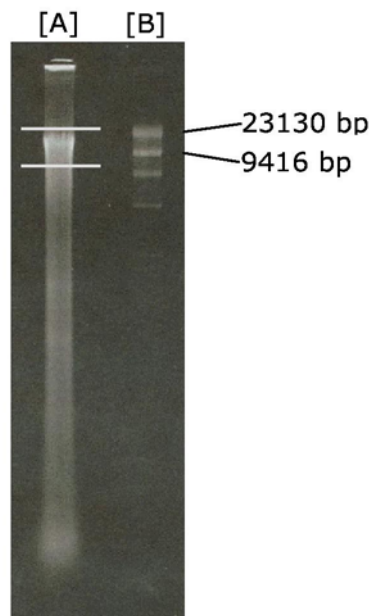


Abb. 3.1 Agarosegelelektrophorese von extrahierter Bioreaktor-DNA (5 µL S2-DNA [A] mit 1.5 µL DNA-Marker II [B]). Die DNA des Gelbereichs zwischen den hellen Linien wurde für die 16S rDNA-Amplifikation eluiert.

3.3 Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken

3.3.1 Anlage der 16S rDNA-Klonbibliotheken

Nach etwa zweimonatiger Kultivierung der DCP-transformierenden Bioreaktormischkultur wurde Probe S2 entnommen, von der ausgehend eine breit angelegte Diversitätsanalyse der Population erfolgte (siehe 1.7). Aus dem DNA-Extrakt von S2 wurden 16S rDNA-Fragmente sowohl von Bakterien (etwa 1550 bp Länge) als auch von Archaea (etwa 1000 bzw. 1400 bp Länge) amplifiziert und in *E. coli* kloniert. Die Klonbibliothek bakterieller 16S rDNA wurde als Klonbibliothek A bezeichnet. Aus ihr leiten sich die "SHA-Klone" ab (für: Saale, Halle, Klonbibliothek A). Mit den Archaea-Klonbibliotheken wurde analog verfahren (Primerpaar 10-30Fa/1390Ra: Klonbibliothek B, "SHB-Klone"; Primerpaar 357Fa/1390Ra: Klonbibliothek C, "SHC-Klone"). Probe S3 wurde dem Bioreaktor etwa 8 Monate nach Probe S2 entnommen. Aus dieser Probe wurde eine weitere bakterielle rDNA-Klonbibliothek angelegt (Klonbibliothek D, "SHD-Klone").

3.3.2 Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliothek A

Die Klonbibliothek A wurde durch eine Kombination aus direktem Sequenzieren der 16S rDNA-Inserts zufällig ausgewählter Klone sowie Dot-Blot-Hybridisierung mittels spezifischer Polynukleotidsonden analysiert (von Wintzingerode et al., 1999). Die Hybridisierung mit Polynukleotidsonden diente dem Auffinden redundanter Klonsequenzen innerhalb der Klonbibliothek. Auf diese Weise konnte der Suchraum und damit der Sequenzier- bzw. Zeitaufwand der Klonanalyse erheblich verringert werden.

Zunächst wurde die Klonbibliothek A auf das Vorhandensein von vier 16S rDNA-Klonsequenzen geprüft, die bei der molekularen Diversitätsanalyse eines Trichlorbenzol (TCB)-transformierenden Bioreaktorkonsortiums gefunden worden waren (SJA-19, SJA-36, SJA-102 sowie SJA-186; von Wintzingerode et al., 1999). Zu diesem Zweck wurden 300 SHA-Klone (SHA-1 bis SHA-300) sukzessive mit von diesen Klonen amplifizierten Polynukleotidsonden hybridisiert. Von allen Sonden reagierte lediglich SJA-19 mit Klon SHA-67. Die anschließende 16S rDNA-Sequenzanalyse von SHA-67 ergab 99.2% Sequenzähnlichkeit zu Klon SJA-19 (Tab. 3.2).

Anschließend wurden die 16S rDNA-Inserts von zunächst 13 zufällig ausgewählten SHA-Klonen (gekennzeichnet mit " * " in Tab. 3.2) sequenziert. Neun dieser Klone wiesen höchste 16S rDNA-Sequenzähnlichkeiten ($\geq 93.2\%$) entweder zu WCHA-, WCHB-, WsCH- bzw. WFeA-Klonen (im Folgenden "Wurtsmith-Sequenzen" genannt; Dojka et al., 1998) oder zu SJA-Klonen auf (im Folgenden "Trichlorbenzol-Sequenzen" genannt; von Wintzingerode et al., 1999). Diese 16S rDNA-Sequenztypen konnten bislang ausschließlich in mit chlorierten Kohlenwasserstoffen belasteten Habitaten gefunden werden. Aus diesem Grunde wurden DIG-markierte 16S rDNA-Fragmente der neun SHA-Klonsequenzen generiert, um deren Verteilung innerhalb der Klone SHA-1 bis SHA-300 durch Dot-Blot-Hybridisierung zu ermitteln. Die 16S rDNA-Inserts aller positiven Klone wurden sequenziert (etwa 1000 bp). Da die Stringenz der Hybridisierungen mit 60°C vergleichsweise niedrig war, wurden teilweise auch Klone mit nur geringer Sequenzähnlichkeit zur jeweiligen Sondensequenz erfaßt. Im Anschluß an die Hybridisierungen erfolgten 16S rDNA-Sequenzierungen (etwa 1550 bp) weiterer 50 zufällig ausgewählter SHA-Klone, so daß nach Abschluß der Analyse von Klonbibliothek A die 16S rDNA-Sequenzen von insgesamt 125 SHA-Klonen vorlagen, die mit den Einträgen von 16S rDNA-Datenbanken verglichen wurden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 16S rDNA-Sequenzen der SHA-Klone und deren ähnlichste 16S rDNA-Sequenzen in Datenbanken.

SHA-Klonfamilie ^a			ähnlichster Datenbankeintrag ^b			weitere Mitglieder der Klonfamilie	
Name (Nummer)	Häufigkeit ^c		Name (Nummer)	Ähnlichkeit ^d [%]		Name	Ähnlichkeit ^e [%]
Cyanobacteria							
SHA-83 (AJ306807)	1		Klon PENDANT-20 (AF142932)	89.0			
Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides							
SHA-5 (AJ306736)	1		Klon WCHB1-69 (AF050545)	89.5			
SHA-7 (AJ249109)	1		Klon WCHB1-29 (AF050544)	93.4			
SHA-13* (AJ306737)	3		Klon SB-1 (AF029039)	91.9		SHA-66	99.9
						SHA-80	99.8
SHA-25* (AJ249101)	1		Klon WCHA1-01 (AF050541)	96.3			
SHA-38 (AJ249105)	2		Klon WCHA1-01 (AF050541)	96.1		SHA-68	97.0
SHA-54 (AJ249107)	1		Klon WCHA1-01 (AF050541)	96.7			
SHA-94 (AJ306738)	1		Klon WCHA2-47 (AF050542)	97.2			
SHA-107 (AJ306739)	2		Klon SB-1 (AF029039)	90.1		SHA-247	99.4
Grüne nicht-schwefelhaltige Bakterien (GNS)							
SHA-2 (AJ306740)	1		Klon SJA-68 (AJ009475)	90.2			
SHA-3 (AJ249106)	1		Klon SJA-15 (AJ009453)	97.2			
SHA-8 (AJ306741)	1		Klon SJA-68 (AJ009475)	87.1			
SHA-20* (AJ306742)	6		Klon SJA-101 (AJ009480)	85.2		SHA-70	98.3
						SHA-120	99.2
						SHA-146	99.0
						SHA-151	99.2
						SHA-191	98.2
SHA-21* (AJ249103)	8		Klon SJA-15 (AJ009453)	98.6		SHA-17	97.6
						SHA-52	98.8
						SHA-99	98.8
						SHA-131	99.0
						SHA-195	98.6
						SHA-269	99.7
						SHA-289	99.4
SHA-24* (AJ249100)	1		Klon WCHB1-43 (AF050564)	97.9			
SHA-26 (AJ306743)	1		Stamm CBDB1 (AF230641)	80.5			
SHA-27 (AJ306744)	4		Klon SJA-116 (AJ009487)	91.5		SHA-81	97.9
							98.1
						SHA-122	97.4
SHA-28* (AJ249094)	1		Klon SJA-58 (AJ009468)	94.5			
SHA-31 (AJ306745)	1		Klon SJA-101 (AJ009480)	85.9			

SHA-Klonfamilie ^a			ähnlichster Datenbankeintrag ^b			weitere Mitglieder der Klonfamilie	
Name	(Nummer)	Häufigkeit ^c	Name	(Nummer)	Ähnlichkeit ^d [%]	Name	Ähnlichkeit ^e [%]
Grüne nicht-schwefelhaltige Bakterien (GNS)							
SHA-36	(AJ306746)	1	Klon SJA-68	(AJ009475)	87.8		
SHA-53	(AJ249111)	1	Klon SJA-61	(AJ009469)	96.4		
SHA-56	(AJ249108)	4	Klon WCHB1-43	(AF050564)	97.9	SHA-93	98.5
						SHA-97	99.4
						SHA-112	97.2
SHA-134	(AJ306747)	1	Klon C1-28	(AJ387901)	88.1		
SHA-135	(AJ306748)	1	Klon SJA-68	(AJ009475)	86.3		
SHA-147	(AJ306749)	1	Klon C1-28	(AJ387901)	90.2		
SHA-300	(AJ249112)	2	Klon SJA-108	(AJ009483)	93.6	SHA-90	99.7
Grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt							
SHA-15*	(AJ306750)	4	Klon WCHB1-84	(AF050591)	90.4	SHA-84	99.3
						SHA-138	99.4
						SHA-202	99.7
SHA-16	(AJ306751)	2	<i>Dehalobacterium formicoaceticum</i>	(X86690)	84.7	SHA-118	98.2
SHA-32	(AJ306752)	2	Klon WsCH1	(AF050627)	91.9	SHA-45	99.5
SHA-33	(AJ249104)	4	Klon WsCH5	(AF050628)	95.1	SHA-63	97.6
						SHA-127	98.7
						SHA-128	97.0
SHA-44	(AJ306753)	1	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	(M23728)	89.0		
SHA-58	(AJ306754)	1	<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i>	(AF016691)	96.6		
SHA-61*	(AJ249095)	4	Klon WsCH5	(AF050628)	96.1	SHA-164	99.3
						SHA-211	99.1
						SHA-260	97.9
SHA-67	(AJ249096)	1	Klon SJA-19	(AJ009454)	99.2		
SHA-74	(AJ306755)	1	Klon BSV27	(AJ229189)	94.7		
SHA-86	(AJ306756)	1	Klon WCHB1-20	(AF050587)	99.2		
SHA-88	(AJ306757)	4	Klon BSV27	(AJ229189)	92.0	SHA-96	98.6
						SHA-103	98.9
						SHA-130	99.1
SHA-98	(AJ306758)	1	<i>Dehalobacterium formicoaceticum</i>	(X86690)	83.9		
SHA-102	(AJ306759)	1	Klon WsCH5	(AF050628)	84.0		
SHA-104	(AJ306760)	1	Klon BB48	(AF129869)	85.9		

SHA-Klonfamilie ^a		ähnlichster Datenbankeintrag ^b			weitere Mitglieder der Klonfamilie	
Name (Nummer)	Häufigkeit ^c	Name (Nummer)	Ähnlichkeit ^d [%]	Name	Ähnlichkeit ^e [%]	
Grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt						
SHA-123 (AJ306761)	1	Clostridium lituseburense (M59107)	97.7			
SHA-219 (AJ249110)	1	Klon WsCH5 (AF050628)	97.1			
Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt						
SHA-34 (AJ306762)	1	Klon BPC063 (AF154093)	87.4			
Holophaga-Acidobacterium-Fibrobacter						
SHA-18* (AJ249099)	1	Klon SJA-149 (AJ009495)	93.2			
SHA-71 (AJ306763)	1	Klon PBR-10 (AJ390480)	98.2			
SHA-261 (AJ306764)	1	Klon OPB3 (AF027004)	92.5			
Planctomycetales						
SHA-6 (AJ306765)	1	Pirellula sp. (X81947)	87.1			
SHA-43 (AJ306766)	1	Pirellula sp. (X81947)	77.0			
SHA-87 (AJ306767)	1	Klon PBR-47 (AJ390484)	90.4			
Proteobacteria (α)						
SHA-85 (AJ306768)	1	Rhizobium sp. (U50168)	98.0			
SHA-91 (AJ306769)	1	Agrobacterium rubi (D01259)	95.6			
Proteobacteria (β)						
SHA-39* (AJ306770)	4	Ultramicrobacterium Stamm 12-3 (AB008507)	99.2	SHA-92 SHA-272 SHA-278	98.8 98.9 99.2	
Proteobacteria (δ)						
SHA-22* (AJ249102)	3	Klon WsCH54 (AF050624)	96.3	SHA-180 SHA-241	99.0 99.5	
SHA-42 (AJ306771)	1	Syntrophus gentianae (X85132)	94.3			
SHA-50* (AJ306772)	1	Stamm BKA11 (AJ012597)	99.0			
SHA-51 (AJ306773)	1	Klon RFLP40 (AF058008)	94.6			
SHA-72* (AJ306774)	1	Klon CE103 (AF211267)	95.7			
SHA-79 (AJ306775)	1	Klon RFLP40 (AF058008)	94.1			
SHA-117 (AJ306776)	1	Stamm EZ-2C2 (AJ012598)	93.7			
SHA-207 (AJ249114)	1	Klon SJA-162 (AJ009498)	97.9			
SHA-237 (AJ306777)	1	Syntrophobacter fumaroxidans (X82874)	98.6			

SHA-Klonfamilie ^a			ähnlichster Datenbankeintrag ^b		weitere Mitglieder der Klonfamilie	
Name (Nummer)	Häufigkeit ^c		Name (Nummer)	Ähnlichkeit ^d [%]	Name	Ähnlichkeit ^e [%]
Proteobacteria (γ)						
SHA-11 (AJ306778)	4		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (U38445)	96.6	SHA-101	99.3
					SHA-129	99.5
					SHA-136	99.3
SHA-35 (AJ306779)	1		Klon SJA-129 (AJ009491)	86.9		
Phylum-Cluster NKB-19 (von Wintzingerode et al., 2000)						
SHA-100 (AJ306780)	1		Klon NKB-19 (AB013271)	91.8		
Gruppe OP8 (Hugenholtz et al., 1998b)						
SHA-89 (AJ249097)	3		Klon WFeA1-59 (AJ249097)	94.2	SHA-115	99.3
					SHA-255	99.8
SHA-124 (AJ306781)	1		Klon WCHA1-83 (AF050553)	97.7		
Phylum-Cluster OP9 (Hugenholtz et al., 1998b)						
SHA-1 (AJ306782)	3		Klon DGGE band 8 (AJ238370)	100.0	SHA-29	98.0
					SHA-110	98.5
SHA-109 (AJ306783)	1		Klon DGGE band 8 (AJ238370)	86.2		
Phylum-Cluster OP10 (Hugenholtz et al., 1998b)						
SHA-37 (AJ306784)	1		Klon OPB50 (AF027092)	80.3		
Phylum-Cluster Saale-1						
SHA-4 (AJ306785)	1		Klon PBS-18 (AJ390485)	86.2		
SHA-9 (AJ306786)	2		Klon PBS-18 (AJ390485)	93.7	SHA-116	97.3
SHA-41 (AJ306787)	1		Klon PBS-18 (AJ390485)	86.7		
Phylum-Cluster Saale-2						
SHA-95 (AJ306788)	1		Klon ACE-42 (AF142817)	95.3		
Phylum-Cluster Saale-3						
SHA-114 (AJ290978)	1		Klon SIC.7255 (AF277496)	90.6		
Keine Zuordnung						
SHA-59 (AJ306790)	1		Klon LGd14 (AF047573)	73.1		

^a Sequenzähnlichkeit $\geq 97.0\%$ zum repräsentativen Klon definiert eine Klonfamilie.

^b Datenbankabgleich wurde 01/2001 durchgeführt.

^c Anzahl der zur Klonfamilie gehörenden Klone in Klonbibliothek A.

^d Angegebene Sequenzähnlichkeit bezieht sich auf den ähnlichsten 16S rDNA-Datenbankeintrag.

^e Angegebene Sequenzähnlichkeit bezieht sich auf den repräsentativen (namensgebenden) Klon der Klonfamilie. Das rDNA-Insert eines solchen Klons wurde jeweils als erstes sequenziert.

■ SHA-Klone mit Sequenzähnlichkeit $\geq 92\%$ zu Wurtsmith- (Dojka et al., 1998) bzw. Trichlorbenzol-Sequenzen (von Wintzingerode et al., 1999).

* Initial sequenzierte Klonsequenzen.

Da bei Bakterien bzw. Archaea derselben Gattung eine 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit von $\geq 97\%$ zu Grunde gelegt wird (Stackebrandt und Goebel, 1994), konnten die 125 SHA-Klone gemäß dieses Kriteriums in 75 Klonfamilien zusammengefaßt werden, die jeweils nach einem repräsentativen Klon benannt wurden (Tab. 3.2). Der überwiegende Teil aller SHA-Klonfamilien (73.7%) umfaßte jeweils nur eine SHA-Klonsequenz. Klonfamilie SHA-21 war mit insgesamt 8 Klonen die größte Klonfamilie.

Gruppierung der SHA-Klonsequenzen innerhalb der bakteriellen Phyla

Die phylogenetische Analyse zeigte, daß der überwiegende Teil der SHA-Klonsequenzen 15 bekannten bakteriellen Phyla zugeordnet werden konnte (Abb. 3.2). Die zu den Grünen nicht-schwefelhaltigen Bakterien (GNS) gehörigen SHA-Klone waren am häufigsten vertreten (36 SHA-Klone in 17 Klonfamilien), gefolgt von den Klonen, die zu den grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt gehörten (30 SHA-Klone in 16 Klonfamilien). Zu den GNS gehörten auch die beiden größten gefundenen Klonfamilien, SHA-21 (8 Klone) sowie SHA-20 (6 Klone).

In zwei Fällen wurden SHA-Klonsequenzen gefunden, die offenbar neue Untergruppen bekannter bakterieller Phyla darstellten. Gruppe SHA-16 (Abb. 3.3) bestand aus vier SHA-Klonsequenzen (SHA-16, -98, -102 und -118), die phylogenetisch eng miteinander verwandt waren und auch bei Anwendung unterschiedlicher Berechnungsalgorithmen mit variierenden Datensätzen stets eine monophyletische Einheit bildeten. Alle vier Sequenzen zeigten maximale Ähnlichkeiten zwischen 83 und 85% zu den Gattungen *Dehalobacterium*, *Thermoanaerobacter* und *Dethiosulfovibrio*, so daß Gruppe SHA-16 als neue Untergruppe der Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt eingeordnet werden konnte. Eine ähnliche Situation lag bei Klon SHA-71 vor, der höchste Sequenzähnlichkeiten zu den Klonen PBR-10, PBS-III-30 sowie TAYNAYA25 aufwies (Abb. 3.3). Diese vier Klone, die in der Gruppe SHA-71 zusammengefaßt wurden, stellen einen monophyletischen Zweig innerhalb des *Holophaga-Acidobacterium-Fibrobacter*-Phylums dar. Bei Vertretern unterschiedlicher bakterieller Phyla wäre der Sequenzunterschied höher und würde mindestens 20 - 25% betragen (Hugenholtz et al., 1998b).

Bei insgesamt sieben gefundenen SHA-Sequenzen war die Zuordnung zu bekannten bakteriellen Phyla nicht möglich. Für sechs dieser sieben SHA-Klonsequenzen konnten anhand der phylogenetischen Analyse drei neue Phylum-Cluster definiert werden, Saale-1 bis Saale-3 (Abb. 3.3). Alle Saale-Gruppen enthalten mindestens zwei enger miteinander verwandte 16S rDNA-Sequenzen ($> 90\%$ Ähnlichkeit). Sie sind auch unter Anwendung unterschiedlicher Berechnungsalgorithmen mit variierenden 16S rDNA-Datensätzen streng monophyletisch und weisen mindestens 25% Sequenzunterschied zu den Vertretern der am nächsten verwandten bakteriellen Phyla auf. Unter Zugrundelegung

dieser Kriterien konnte Klonsequenz SHA-59 nicht sicher zugeordnet werden, da keine nähere Verwandtschaft zu 16S rDNA-Datenbankeinträgen bzw. zu anderen SHA-Klonsequenzen bestand.

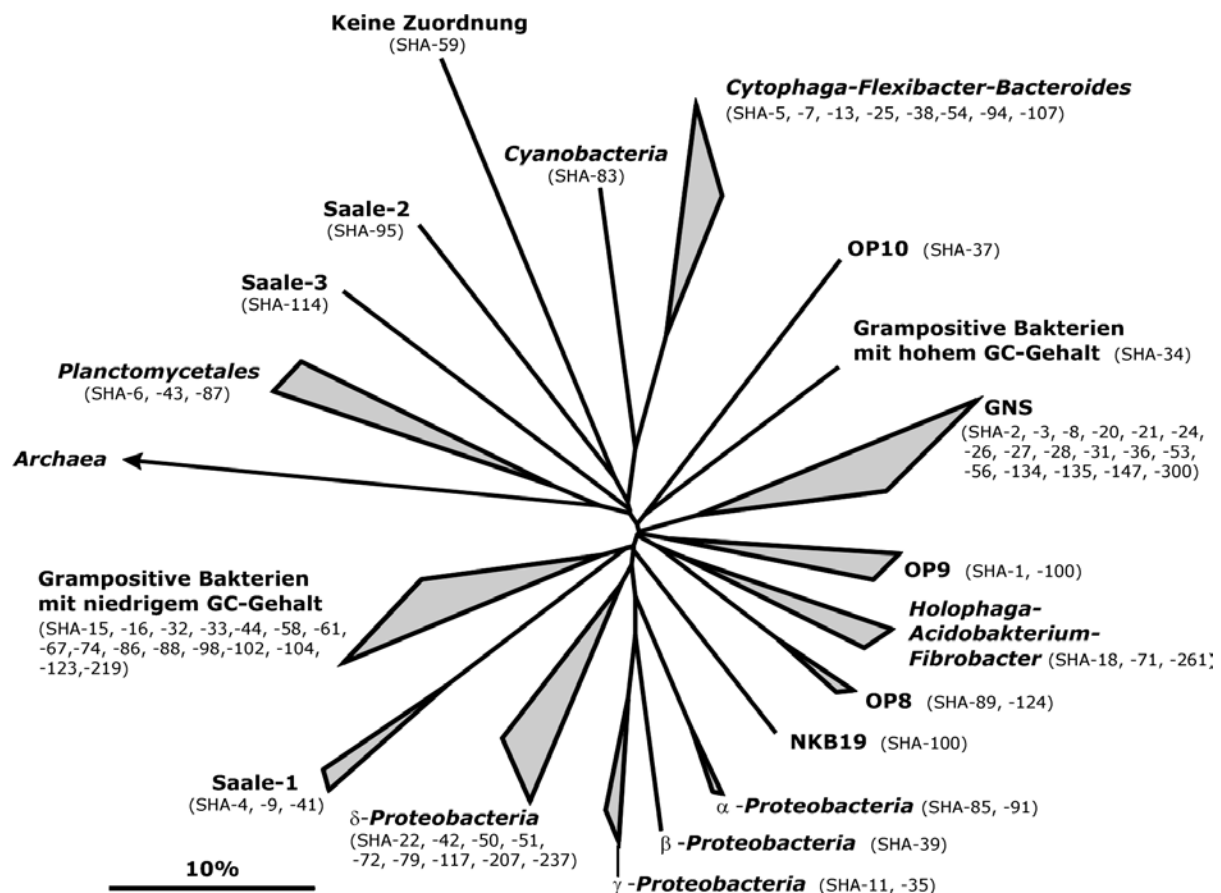


Abb. 3.2 Verteilung der 75 SHA-Klonfamilien repräsentierenden SHA-Klone innerhalb der bakteriellen Phyla bzw. Phylum-Cluster. Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenz von *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) wurde als Bezugsgruppe gewählt. Die Summe der Astlängen kennzeichnet die phylogenetische Distanz zwischen den Vertretern der einzelnen bakteriellen Phyla. Die Größe der Fläche eines jeweiligen Astes korrespondiert mit der Anzahl der dargestellten SHA-Klonsequenzen.

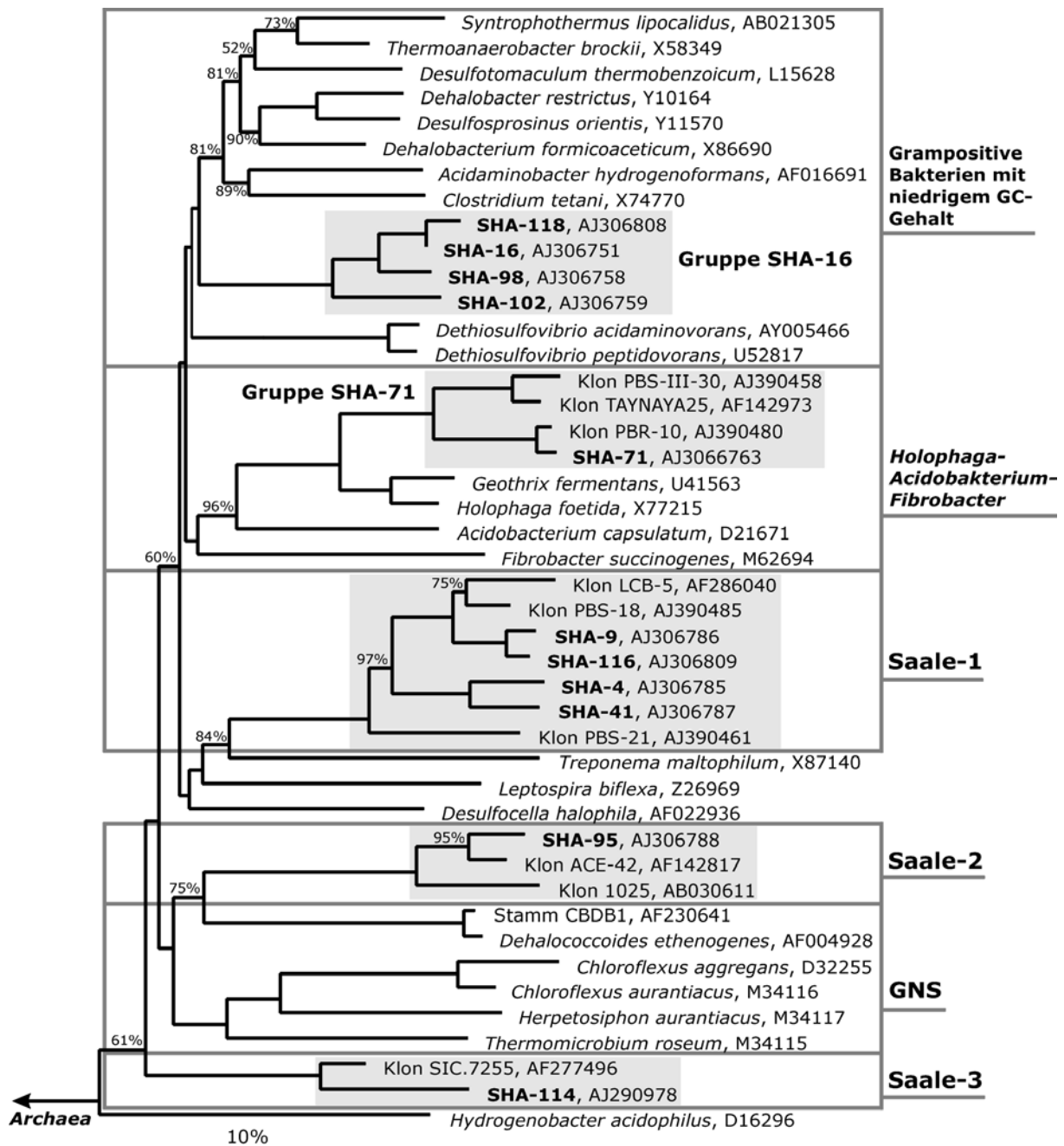


Abb. 3.3 Phylogenetische Einordnung von SHA-Klonsequenzen, die neuen bakteriellen Untergruppen bzw. Phylum-Clustern zugeordnet wurden (grau hinterlegt). Bakterielle Phyla werden durch einen Rahmen hervorgehoben. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenzen von *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) und *Methanosaeta concilii* (X16932) wurden als Außengruppe gewählt. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrapanalyse mit 1000-facher Replikation geprüft. Die Verzweigungswahrscheinlichkeiten sind durch Prozentangaben dargestellt. Die Baumtopologie wurde durch eine PHYLIP-PARSIMONY-Analyse des gleichen Datensatzes verifiziert. Die Summe der horizontalen Astlängen kennzeichnet die phylogenetische Distanz zwischen den einzelnen 16S rDNA-Sequenzen.

Ähnlichkeiten der SHA-Klone zu 16S rDNA-Datenbankeinträgen

Nur eine der ermittelten SHA-Sequenzen zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit einer in 16S rDNA-Datenbanken hinterlegten Sequenz (Klon SHA-1 mit Klon DGGE band 8, Tab. 3.2). Da es sich jedoch bei der aus einem DGGE-Gel isolierten "DGGE band 8"-16S rDNA lediglich um ein 563 bp langes Nukleinsäure-Fragment handelt, kann nicht von einer Identität des gesamten 16S rRNA-Gens beider mikrobieller Spezies ausgegangen werden. Wird wiederum eine 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit von 97 bis 100% innerhalb einer bakteriellen Gattung zugrunde gelegt (Stackebrandt und Göbel, 1994), repräsentieren etwa 23% der SHA-Klonfamilien bekannte kultivierte bzw. bislang nicht-kultivierte Bakteriengattungen. So konnten 16S rDNA-Sequenzen der Gattungen *Clostridium*, *Rhizobium*, *Ultramicrobacterium*, *Syntrophobacter* und *Dehalobacter* nachgewiesen werden. Bei zwei Klonfamilien (SHA-11, SHA-58) lagen Sequenzähnlichkeiten von 96.6% zu Vertretern der Gattungen *Pseudomonas* bzw. *Acidaminobacter* sowie 94.3% zur Gattung *Syntrophus* vor. Klon SHA-50 wies nahezu vollständige Sequenzübereinstimmung (99%) zum bakteriellen Isolat BKA-11 auf (Wind et al., 1999). Besonders hervorzuheben ist Klon SHA-67, der eine Sequenzähnlichkeit von 98.7% zu *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA aufwies (Wild et al., 1996). Bakterien der Gattung *Dehalobacter* sind in der Lage, Tri- und Tetrachlorethen reaktiv zu dechlorieren.

Gruppierung der SHA-Klone mit Wurtsmith- und Trichlorbenzol-Klonsequenzen

Die vergleichende 16S rDNA-Analyse der Klonbibliothek A ergab, daß für rund die Hälfte aller SHA-Klone Wurtsmith- (Dojka et al., 1998) bzw. Trichlorbenzol-Sequenztypen (von Wintzingerode et al., 1999) die ähnlichsten Sequenzen darstellten (Sequenzähnlichkeiten zwischen 85.2 und 99.2%). Über ein Drittel aller SHA-Klone stand dabei in engerer phylogenetischer Verwandtschaft zu diesen bislang ausschließlich in anaeroben CKW-belasteten Habitaten nachgewiesenen 16S rDNA-Sequenzen. Wie aus Tab. 3.2 ersichtlich (grau hinterlegt), zeigten 22 SHA-Klonfamilien (35.2% aller SHA-Klone) über 92% Sequenzähnlichkeit zu den Wurtsmith- oder Trichlorbenzol-Sequenzen. Von diesen 22 SHA-Klonfamilien konnten 14 Klonfamilien in sechs bakterielle monophyletische 16S rDNA-Sequenzuntergruppen oder "Cluster" eingeordnet werden (Abb. 3.4). Diese Cluster (SHA-I bis SHA-VI) basierten auf DNA-Ähnlichkeitswerten von $\geq 92\%$ zwischen allen jeweils dazugehörigen 16S rDNA-Sequenzen und beinhalteten mindestens drei Klone. Vier der sechs SHA-Cluster (SHA-I, -II, -III und -V) umfaßten ausschließlich 16S rDNA-Sequenzen, die bislang nur in anaeroben mit chlorierten Kohlenwasserstoffen belasteten Habitaten nachgewiesen worden waren. Cluster SHA-IV sowie SHA-VI beinhalteten insgesamt drei 16S rDNA-Sequenzen, die auch in nicht mit CKW-kontaminierten anaeroben Biotopen gefunden worden waren (SHA-IV: *Syntrophobotulus glycolicus* (Friedrich et al., 1996); SHA-VI: Klon LD21 (Zwart et al., 1998), *Cytophaga* sp. Stamm

BD1-16 (Li et al., 1999)). Insgesamt jedoch ließen sich die SHA-Sequenzcluster I - VI phylogenetisch klar von den verfügbaren 16S rDNA-Sequenzen aus CKW-unbelasteten anaeroben Habitaten trennen, da ein Sequenzunterschied von mindestens 10.5% zu den nächst-verwandten Sequenzen vorlag. Im Falle der acht nicht zu den SHA-Clustern gehörenden SHA-Klonfamilien, die eng mit Wurtsmith- bzw. Trichlorbenzol-Sequenztypen verwandt sind (SHA-7, -18, -28, -53, -86, -89, -94, -124), lagen Sequenzunterschiede zu den 16S rDNA-Sequenzen anderer Habitate von mindestens 9.1% vor. Im dargestellten Dendogramm (Abb. 3.4) sind zwei 16S rDNA-Sequenzgruppen enthalten, die in marinen mit CKW belasteten anaeroben Lebensräumen nachgewiesen wurden (RFLP-Sequenzen, Pulliam-Holoman et al., 1998; ST-Sequenzen, Kengen et al., 1999). Auch von diesen 16S rDNA-Sequenztypen sind alle genannten SHA-Klonfamilien phylogenetisch deutlich entfernt. Eine Ausnahme stellen die zu den δ -Proteobakterien gehörenden Klone SHA-42, -51 und -79 dar. Diese Klone, die mit der Gattung *Syntrophus* phylogenetisch eng verwandt sind, weisen Sequenzähnlichkeiten von etwa 94% zu Klon RFLP40 auf.

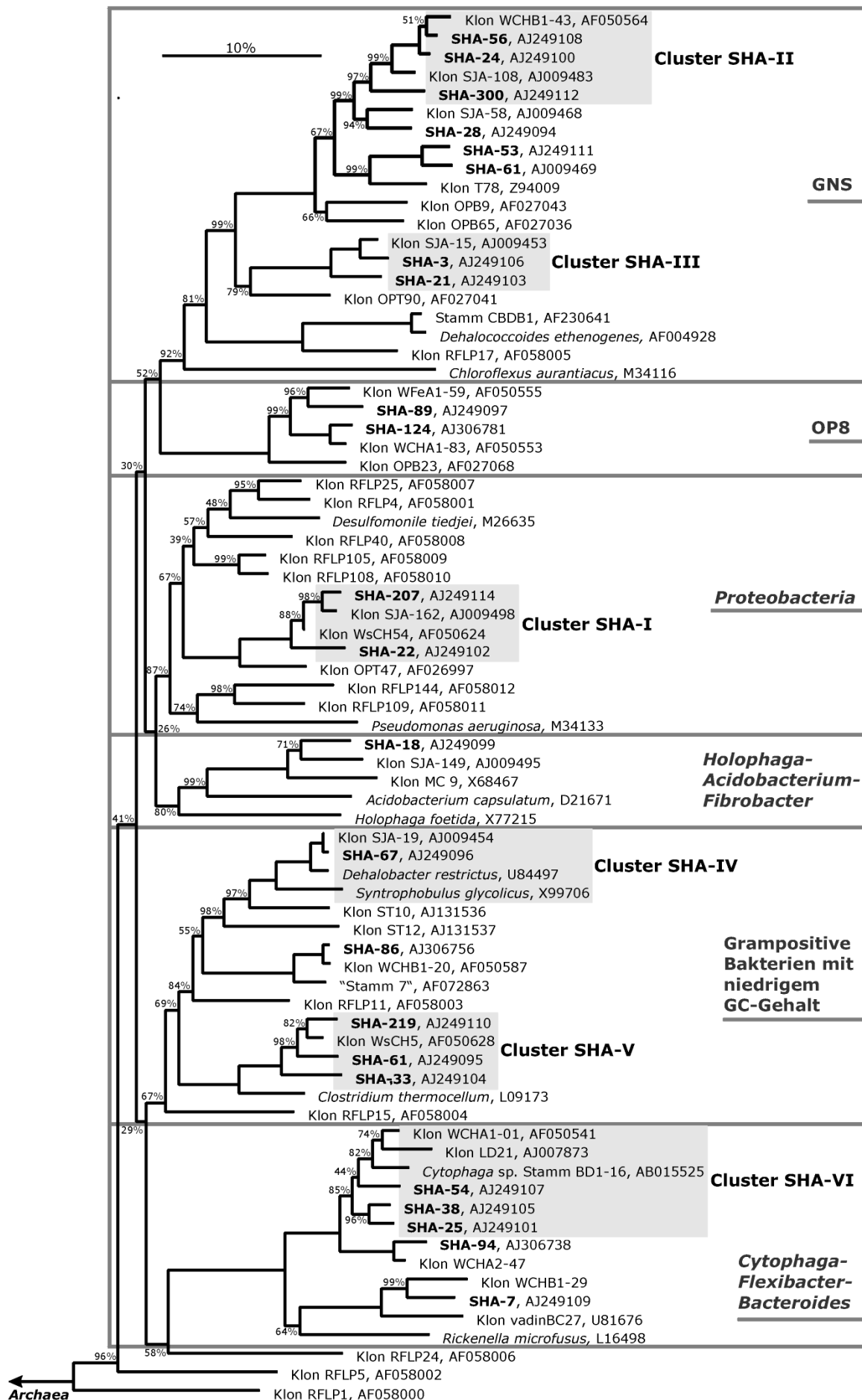


Abb. 3.4 Phylogenetische Einordnung von SHA-Klonsequenzen, die eng mit WurtSmith- (WCHA-, WCHB-, WsCH- und WFeA-Klone; Doijka et al., 1998) und Trichlorbenzol-Klonsequenzen (SJA-Klone; von Wintzingerode et al., 1999) verwandt sind. Bakterielle Phyla sind durch Rahmen gekennzeichnet. Die spezifischen SHA-Sequenzcluster sind grau hervorgehoben. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenzen von *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) und *Methanosaeta concilii* (X16932) wurden als Außengruppe gewählt. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrapanalyse mit 1000-facher Replikation geprüft. Die Verzweigungswahrscheinlichkeiten sind durch Prozentangaben dargestellt. Die Topologie wurde durch eine PHYLIP-PARSIMONY-Analyse des gleichen Datensatzes verifiziert. Die Summe der horizontalen Astlängen kennzeichnet die phylogenetische Distanz zu jeweils anderen 16S rDNA-Sequenzen.

3.3.3 Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliotheken B und C

Zunächst wurden die 16S rDNA-Inserts von jeweils zwei zufällig ausgewählten SHB- bzw. SHC-Klonen direkt sequenziert (etwa 1000 - 1400 bp). Die Klone SHB-143 sowie SHC-10 zeigten Sequenzähnlichkeiten von $\geq 98.7\%$ zu *Methanomethylovorans hollandica* (Lomans et al., 1999), während die Klone SHB-23 und SHC-216 Sequenzähnlichkeiten von $\geq 99.3\%$ zu *Methanosaeta concilii* aufwiesen (Abb. 3.5). Daraufhin wurde die Abundanz von 16S rDNA-Sequenzen beider methanogenen Archaea innerhalb der Klonbibliotheken B und C durch Dot-Blot-Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotidsonden ermittelt. Dazu wurde die Plasmid-DNA von jeweils 50 SHB- bzw. SHC-Klonen auf Nylonmembranen aufgebracht. Zunächst wurde die Anwesenheit rekombinanter Archaea-Klone durch Hybridisierung mit einer strangbindenden Archaea-spezifischen Oligonukleotidsonde (ARCH915) überprüft. Die Analyse ergab, daß alle Klone, mit Ausnahme von Klon SHC-42, archaeale 16S rDNA-Inserts besaßen. Zur Bestimmung der Zahl *Methanosaeta*-ähnlicher Klone wurde das Oligonukleotid MCONC verwendet, das spezifisch für *Methanosaeta concilii* bzw. für die Klonsequenzen SHB-23 und SHC-216 ist (von Wintzingerode et al., 1999). Von jeweils 50 SHB- sowie 49 SHC-Klonen hybridisierten mit der Sonde MCONC unter stringenten Bedingungen (52°C) 19 SHB-Klone (38%) und 12 SHC-Klone (24.5%) (Abb. 3.6). Um die Verteilung der *Methanomethylovorans*-ähnlichen Klonsequenzen in den Klonbibliotheken A und B zu analysieren, wurde eine neue Oligonukleotidsonde entwickelt, die spezifisch für *Methanomethylovorans hollandica* sowie die Klone SHB-143 und SHC-10 war (MHOLL). Unter stringenten Bedingungen (55.5°C) führte die Hybridisierung der 50 SHB- bzw. 49 SHC-Klone mit dem Oligonukleotid MHOLL zu insgesamt 29 positiven SHB- (58%) und 36 positiven SHC-Klonen (73.5%) (Abb. 3.6).

Die Spezifität aller Hybridisierungsexperimente wurde durch die Verwendung geeigneter

Kontroll-DNA einschließlich bereits sequenzierter Klone sichergestellt. Die jeweilige Überprüfung der Insertsequenz einiger positiver SHB- bzw. SHC-Klone zeigte in allen Fällen komplette Übereinstimmung.

Ein Klon, SHC-40, reagierte nach Hybridisierung mit beiden Oligonukleotidsonden, MCONC bzw. MHOLL (Abb. 3.6). Zur Kontrolle wurde das 16S rDNA-Insert dieses Klon sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die Sequenzauswertung ergab eine über 99 prozentige Sequenzähnlichkeit zu *Methanomethylovorans hollandica* der *E. coli*-Positionen 403 – 800 sowie zu *Methanosaeta concilii* der *E. coli*-Positionen 800 – 1401, so daß es sich bei Klon SHC-40 offenbar um eine 16S rDNA-Sequenzchimäre handelt (siehe 3.3.5). Insgesamt drei SHB- bzw. SHC-Klone (SHB-200, SHC-88, SHC-268) reagierten weder mit der MCONC- noch mit der MHOLL-Oligonukleotidsonde (Abb. 3.6). Die 16S rDNA-Inserts dieser Klone wurden ebenfalls sequenziert. Die Klone SHB-200 sowie SHC-88 zeigten über 97% Sequenzähnlichkeit zu Klon WCHD3-07 (Abb. 3.5), der im Rahmen der 16S rDNA-Analyse des Wurtsmith-Standortes (Dojka et al., 1998) gefunden worden war. Klon SHC-268 wies dagegen 98% Sequenzähnlichkeit zu *Methanocorpusculum labreanum* auf (Zellner et al., 1989; Abb. 3.5).

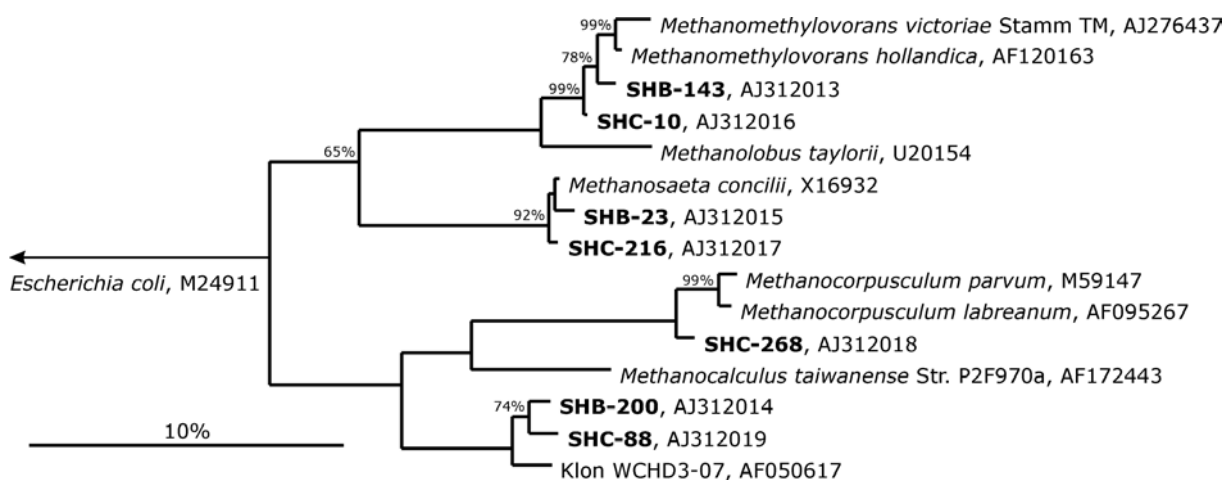
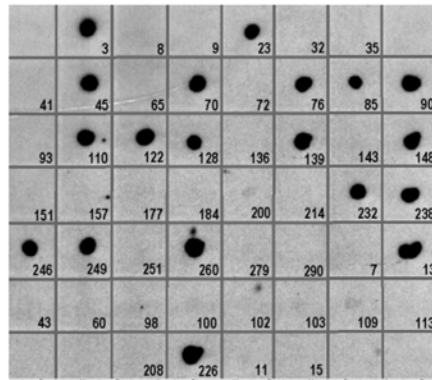
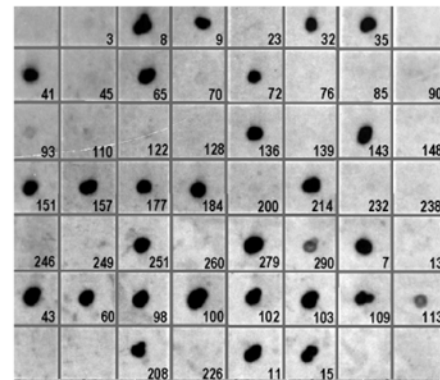


Abb. 3.5 Phylogenetische Zuordnung der SHB- bzw. SHC-Klonsequenzen zu 16S rRNA-Datenbankeinträgen methanogener Archaea. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenz von *E. coli* wurde als Bezugssequenz gewählt. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrapanalyse mit 1000-facher Replikation geprüft. Die Verzweigungswahrscheinlichkeiten sind durch die Prozentangaben dargestellt. Die Baumtopologie wurde durch eine PHYLIP-PARSIMONY-Analyse des gleichen Datensatzes verifiziert. Die Astlänge kennzeichnet die phylogenetische Distanz zwischen den einzelnen 16S rDNA-Sequenzen.

i) SHB-Klone

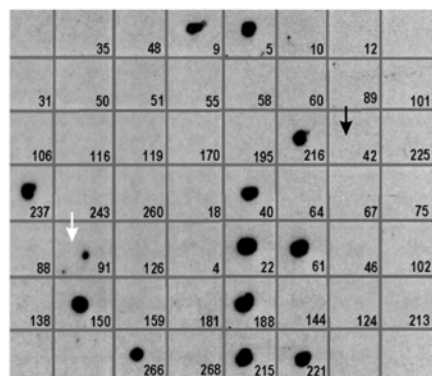


Sonde MCONC

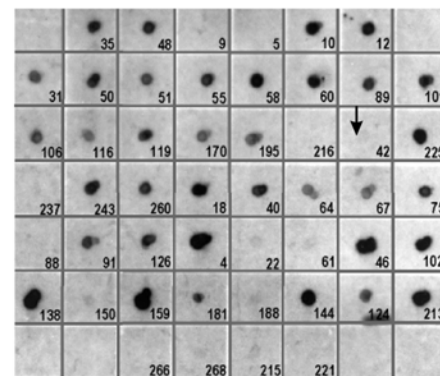


Sonde MHOLL

i) SHC-Klone



Sonde MCONC



Sonde MHOLL

Abb. 3.6 Dot-Blot-Hybridisierung rekombinanter Klone der Genbibliotheken B und C mit den Oligonukleotidsonden MCONC und MHOLL. Die Nummern geben den jeweiligen SHB- bzw. SHC-Klon an. Klon SHC-42 enthielt kein archaeales 16S rDNA-Insert (schwarze Pfeile). Das Signal von Klon SHC-91 nach Hybridisierung mit MCONC stellte eine unspezifische Farbreaktion dar (weißer Pfeil).

3.3.4 Zusammensetzung und phylogenetische Analyse der Klonbibliothek D

Durch Anlage und Analyse von Klonbibliothek D sollte im wesentlichen untersucht werden, ob die zu den spezifischen SHA-Clustern I - VI gehörenden 16S rDNA-Sequenzen (siehe 3.3.2) auch noch nach einem längeren Zeitraum (8 Monate) in der Bioreaktorpopulation nachzuweisen waren. Zu diesem Zweck wurden 300 SHD-Klone durch Dot-Blot-Hybridisierung mit DIG-markierten Polynukleotidsonden durchgemustert. Die Polynukleotidsonden wurden von 16S rDNA-Sequenzen abgeleitet, die jeweils zu einem der spezifischen Cluster SHA-I bis SHA-VI gehörten (Cluster SHA-I: Klone SHA-22, SHA-207, SJA-162; Cluster SHA-II: Klone SHA-24, SHA-56, SHA-300, SJA-108; Cluster SHA-III: Klone SHA-3, SHA-21, SJA-15; Cluster SHA-IV: Klone SHA-67, SJA-19 sowie *Dehalobacter restrictus*; Cluster SHA-V: Klone SHA-33, SHA-61, SHA-219; Cluster SHA-VI: SHA-25, SHA-38, SHA-54). Die DIG-markierten Polynukleotidsonden eines jeweiligen

SHA-Clusters wurden zu gleichen Teilen vereint und die daraus resultierenden Sondengemische zur Dot-Blot-Hybridisierung der Klonbibliothek D eingesetzt. Im Anschluß daran erfolgte eine weitere Hybridisierung der SHD-Klone lediglich mit einer *Dehalobacter restrictus*-spezifischen Sonde.

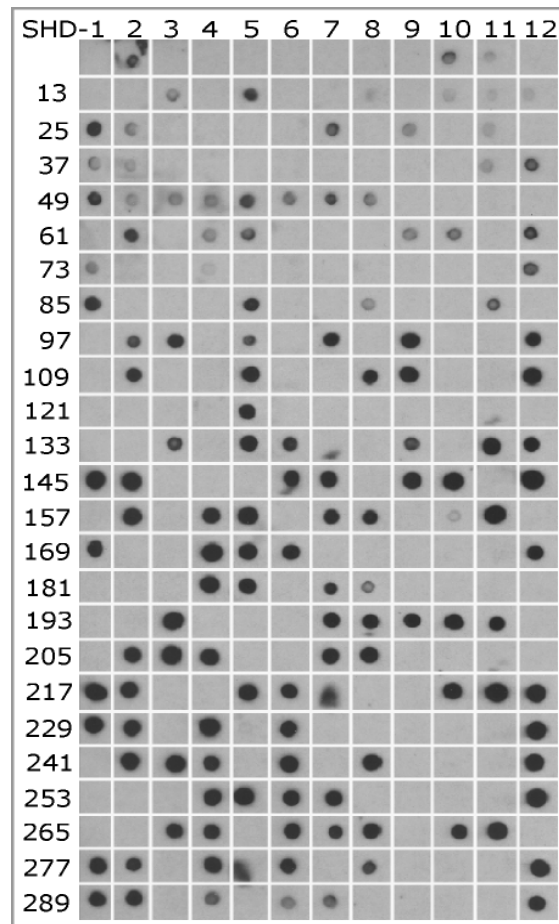


Abb. 3.7 Dot-Blot-Hybridisierung von 300 SHD-Klonen mit der *Dehalobacter restrictus*-spezifischen Polynukleotidsonde. Die Nummern geben den jeweiligen SHD-Klon an. Zur Kontrolle wurde die 16S rDNA-Inserts der Klone SHD-2, -10, -11, -15, -17, -25, -49, -212 und -300 sequenziert (Tab. 3.3).

Nach diesen insgesamt sieben Dot-Blot-Hybridisierungen wurden die 16S rDNA-Inserts aller positiven SHD-Klone sequenziert (~1550 bp) und phylogenetisch analysiert. Bei den zwei Hybridisierungen, sowohl mit dem Cluster-IV-Sondengemisch als auch mit der *Dehalobacter restrictus*-spezifischen Sonde, reagierten jeweils 130 identische SHD-Klone (Abb. 3.7). Aufgrund dieser hohen Zahl wurden die 16S rDNA-Inserts von lediglich neun SHD-Klonen zur Kontrolle sequenziert. Sieben dieser neun Klone wiesen $\geq 99.5\%$ Ähnlichkeit zur 16S rDNA von *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA (Wild et al., 1996) auf (Klonfamilie SHD-11). Die verbliebenen zwei SHD-Klone waren mit der Gattung

Dehalobacter nur entfernt verwandt, ließen sich aber den grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt zuordnen (Klone SHD-2, SHD-17). Es konnte folglich davon ausgegangen werden, daß etwa 100 von 130 positiv hybridisierten SHD-Klonen *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA-identische 16S rDNA-Inserts trugen.

Wie schon bei den SHA-Klonen (3.3.2) wurden diejenigen SHD-Klone, die untereinander eine Sequenzähnlichkeit von $\geq 97\%$ aufwiesen (Stackebrandt und Goebel, 1994), in insgesamt 28 distinkte Klonfamilien zusammengefaßt (Tab. 3.3). Dabei konnten 12 der 28 SHD-Klonfamilien den spezifischen SHA-Sequenzclustern SHA-I bis SHA-V zugeordnet werden (Abb. 3.8; grau hinterlegt in Tab. 3.3). Diese 12 SHD-Klonfamilien wiesen mindestens 92% Ähnlichkeit zu allen anderen 16S rDNA-Sequenzen eines jeweiligen SHA-Clusters auf. Mit Ausnahme von Cluster SHA-VI konnten mit allen SHA-Clustern korrespondierende 16S rDNA-Sequenzen in Klonbibliothek D nachgewiesen werden. Die zu Cluster SHA-IV gehörenden SHD-Klone trugen ausschließlich zu *Dehalobacter restrictus*-identische 16S rDNA-Inserts. Sie waren mit einer Anzahl von etwa 100 die am häufigsten gefundenen rDNA-Sequenztypen innerhalb der Klonbibliothek D. Dies entsprach einem Drittel der insgesamt 300 untersuchten SHD-Klone.

Durch vergleichsweise niedrige Stringenzbedingungen bei der Hybridisierung wurde gewährleistet, daß alle mit einem SHA-Cluster korrespondierenden Klone innerhalb der 300 SHD-Klone nachgewiesen werden konnten. Auf diese Weise wurden jedoch auch Klone erfaßt, die zwar nicht mit einem der SHA-Cluster korrespondierten, jedoch innerhalb des entsprechenden bakteriellen Phylums gruppierten. Dadurch wurden zahlreiche Klone nachgewiesen, die vor allem zur Gruppe der GNS, jedoch nicht zu den entsprechenden Clustern SHA-II bzw. SHA-III gehörten (Tab. 3.3).

Da in der unter 3.4 dargestellten DGGE-Analyse der Bioreaktorkultur *Dehalococcoides*-ähnliche 16S rDNA-Sequenzen gefunden worden waren (Klone SHE-134 bis SHE-136), sollte Klonbibliothek D hinsichtlich des Vorkommens dieser Sequenzen untersucht werden. Dazu wurde die 16S rDNA des Klons SHE-134 unter Verwendung des Primerpaares F-968/R-1401 (ohne GC-Klammer) sowie Digoxigenin-markierten dNTPs reamplifiziert. Jedoch hybridisierte diese *Dehalococcoides*-spezifische Polynukleotidsonde mit keinem der 300 SHD-Klone aus Klonbibliothek D.

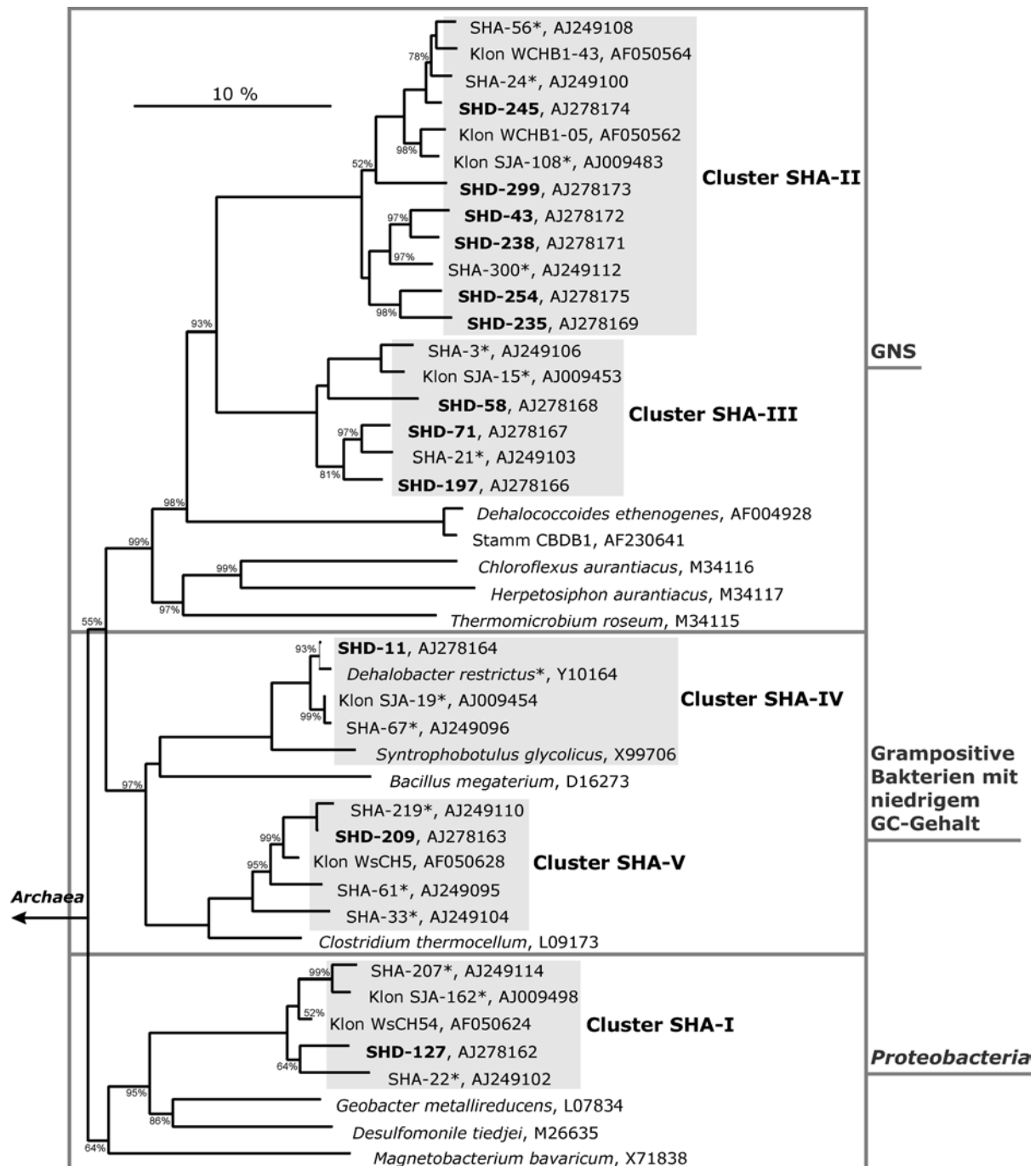


Abb. 3.8 Phylogenetische Einordnung der SHD-Klonsequenzen, die innerhalb der spezifischen SHA-Cluster gruppieren (grau hervorgehoben). Bakterielle Phyla sind durch Rahmen gekennzeichnet. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenzen von *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) und *Methanosaeta concilii* (X16932) wurden als Außengruppe gewählt. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrapanalyse mit 1000-facher Replikation geprüft. Die Verzweigungswahrscheinlichkeiten sind durch Prozentangaben dargestellt. Die Baumtopologie wurde durch eine PHYLIP-PARSIMONY-Analyse des gleichen Datensatzes verifiziert. Die Astlänge kennzeichnet die phylogenetische Distanz zwischen den einzelnen 16S rDNA-Sequenzen.

Tab. 3.3 Phylogenetische Zuordnung der SHD-Klonfamilien.

SHD-Klonfamilie ^a			ähnlichster Datenbankeintrag ^b			weitere Mitglieder der Klonfamilie	
Name	(Nummer)	Häufigkeit ^c	Name	(Nummer)	Ähnlichkeit ^d [%]	Klon	Ähnlichkeit ^e [%]
Grüne nicht-schwefelhaltige Bakterien (GNS)							
SHD-6	(AJ306791)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	87.6		
SHD-12	(AJ306792)	1	Klon SJA-15	(AJ009453)	90.3		
SHD-14	(AJ306793)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	93.4		
SHD-43	(AJ278172)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	98.0		
SHD-58	(AJ278168)	1	Klon SJA-15	(AJ009453)	91.5		
SHD-71	(AJ278167)	1	Klon SJA-15	(AJ009453)	91.6		
SHD-100	(AJ306794)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	89.6		
SHD-157	(AJ306795)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	90.3		
SHD-190	(AJ306796)	4	Klon SJA-108	(AJ009483)	92.4	SHD-186 SHD-223 SHD-225	97.2 98.6 99.0
SHD-194	(AJ306797)	1	Klon SJA-15	(AJ009453)	88.2		
SHD-197	(AJ278166)	1	Klon SJA-15	(AJ009453)	91.0		
SHD-231	(AJ306798)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	89.3		
SHD-235	(AJ278169)	2	Klon SJA-108	(AJ009483)	92.7	SHA-236	99.6
SHD-238	(AJ278171)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	98.3		
SHD-245	(AJ278174)	2	Klon WCHB1-43	(AF050564)	97.9	SHD-133	97.8
SHD-249	(AJ306799)	1	Klon SJA-116	(AJ009468)	89.5		
SHD-254	(AJ278175)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	92.5		
SHD-255	(AJ306800)	1	Klon WCHB1-43	(AF050564)	92.0		
SHD-262	(AJ306801)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	89.7		
SHD-269	(AJ306802)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	84.9		
SHD-299	(AJ278173)	1	Klon SJA-108	(AJ009483)	93.9		
Grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt							
SHD-2	(AJ306803)	1	<i>Dehalobacter restrictus</i> St. TEA (Y10164)		95.4		
SHD-11	(AJ278164)	~100 ^f	<i>Dehalobacter restrictus</i> St. TEA (Y10164)		99.5	SHD-10 SHD-15 SHD-25 SHD-49 SHD-212 SHD-300	99.9 99.5 99.6 99.8 99.7 99.7
SHD-17	(AJ306804)	1	<i>Dehalobacter restrictus</i> St. TEA (Y10164)		91.7		
SHD-209	(AJ278163)	1	Klon WsCH5		97.3		

<i>Proteobacteria</i> (δ)						
SHD-1	(AJ306805)	1	<i>Syntrophobacter</i>		95.2	
			<i>wolinii</i> (X70905)			
SHD-4	(AJ306806)	1	Klon RFLP40 (AF058008)		90.5	
SHD-127	(AJ278162)	1	Klon WsCH54 (AF050624)		96.6	

^a Sequenzähnlichkeit $\geq 97.0\%$ zum repräsentativen Klon definiert eine Klonfamilie.

^b Ausgenommen SHA-Klonsequenzen. Der Datenbankabgleich wurde Januar 2001 durchgeführt.

^c Anzahl der zur Klonfamilie gehörigen Klone in Klonbibliothek D.

^d Angegebene Sequenzähnlichkeit bezieht sich auf den ähnlichsten 16S rDNA-Datenbankeintrag.

^e Angegebene Sequenzähnlichkeit bezieht sich auf den repräsentativen Klon der Klonfamilie.

^f Abschätzung basierend auf Kontrollsequenzierung von neun positiv-hybridisierten SHD-Klonen (Cluster SHA-IV- bzw. *Dehalobacter restrictus*-spezifische Polynukleotidsonde).

■ SHD-Klone, die in SHA-Cluster eingeordnet werden konnten (SHA-I bis SHA-V).

3.3.5 Bestimmung chimärer 16S rDNA-Sequenzen

Bei der gleichzeitigen in-vitro-Amplifikation homologer DNA können Mischsequenzen entstehen, die aus mindestens zwei verschiedenen DNA-Fragmenten zusammengesetzt sind. Diese Amplifikations-Artefakte werden als Sequenzchimären bezeichnet. Bei der Analyse mikrobieller Lebensräume mittels vergleichender rDNA-Sequenzanalyse kann das Auftreten von Chimären zu einer Fehleinschätzung mikrobieller Diversität führen. Ob eine 16S rDNA-Sequenz eine Chimäre darstellt, kann durch einen getrennten Vergleich verschiedener Sequenzbereiche mit Datenbankeinträgen festgestellt werden (CHECK-CHIMERA; Larsen et al., 1993). Weisen Bereiche einer Sequenz jeweils unterschiedliche Ähnlichkeiten zu entsprechenden Datenbankeinträgen auf, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß es sich um ein PCR-Artefakt handelt.

Mit Hilfe des CHECK-CHIMERA-Programms konnten drei 16S rDNA-Sequenzen der Klonbibliotheken A und D zweifelsfrei als Chimären identifiziert werden (SHA-113, SHD-91, SHD-210). Mit Ausnahme einer Klonsequenz (SHC-40), die sich eindeutig als Chimäre aus *Methanomethylovorans hollandica* und *Methanosaeta concilii* herausstellte (siehe 3.3.3), war die Überprüfung der SHB- und SHC-Klone mit CHECK-CHIMERA nicht erforderlich.

3.4 Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch DGGE

Um die Zusammensetzung der Bioreaktorpopulation über einen längeren Zeitraum (14 Monate) zu erfassen, wurde bakterielle 16S rDNA von vier Bioreaktorproben (S1 - S4, siehe Tab. 3.1) mittels Denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) untersucht. Verwendet wurde PCR-amplifizierte 16S rDNA der vier Bioreaktorproben sowie das entsprechend amplifizierte 16S rDNA-Fragment von *Dehalobacter restrictus* als Kontrolle. Da *Dehalobacter*-identische Klonsequenzen in den Klonbibliotheken A und D gefunden worden waren, sollte eine *Dehalobacter*-16S rDNA-Bande der Identifizierung von rDNA-Banden amplifizierter Bioreaktorproben dienen.

3.4.1 Analyse des DGGE-Gels

Die etwa 435 bp langen 16S rDNA-Fragmente wurden in einem Polyacrylamidgel, das mit einen denaturierenden Gradienten aus Harnstoff und Formamid versehen war, in Abhängigkeit ihrer Schmelzeigenschaften aufgetrennt. Nach Silberfärbung des DGGE-Gels war eine hohe Bandenzahl erkennbar, die bei jeder Bioreaktorprobe mehr oder weniger unterschiedliche Muster aufwies (Abb. 3.9). Bei allen vier Reaktorproben lag die Anzahl eindeutig diskriminierbarer Banden ("band richness", S) in der Größenordnung von 30 (S1: 35, S2: 30, S3: 28, S4: 30). In allen vier Fällen war jedoch auch ein mehr oder weniger starker unspezifischer Hintergrund zu erkennen. Im unteren Bereich des in Abb. 3.9 dargestellten DGGE-Gels waren einzelsträngige DNA-Fragmente für den Hintergrund verantwortlich. Diese wurden durch die Silberfärbung miterfaßt. Beim Vergleich der Probenprofile S1 - S4 fiel auf, daß die Bandenmuster von S3 und S4 nahezu identisch waren, während sich vor allem das Bandenmuster von S1 deutlich von denen anderer Proben unterschied. Um diesen Eindruck überprüfen zu können, wurden die Bandenmuster durch Ermittlung des sogenannten Sorenson-Index', C_s , miteinander verglichen. Ein C_s -Wert von 1 beschreibt die Identität zweier Bandenmuster, ein Wert von 0 das Fehlen jeglicher Bandengleichheit. Die ermittelten Sorenson-Indizes der vier Bioreaktorproben sind in Tab. 3.4 dargestellt. Die Bandenmuster der Proben S3 und S4 zeigten die höchsten bzw. die von S1 und S2 die niedrigsten Werte.

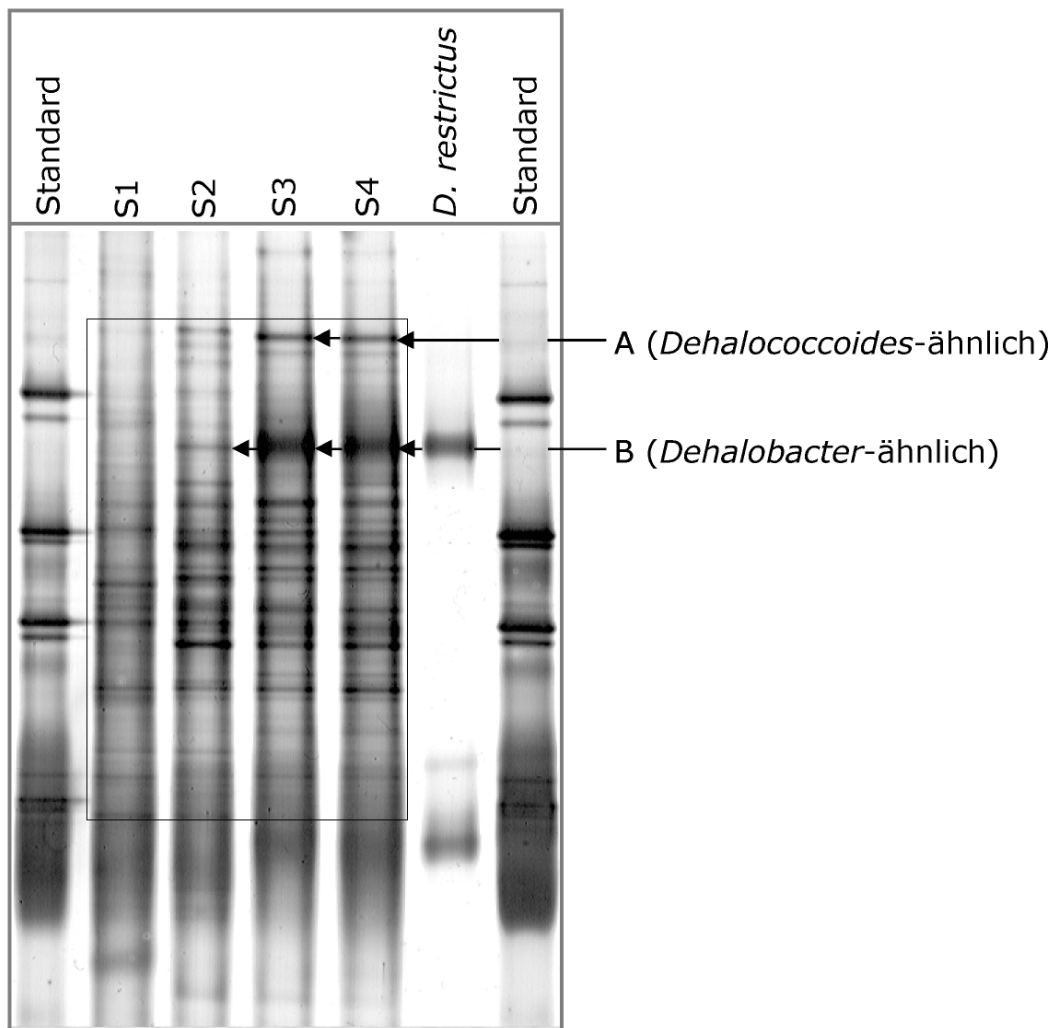


Abb. 3.9 Silber-gefärbtes DGGE-Gel nach Auftrennung amplifizierter 16S rDNA-Fragmente (*E. coli*-Positionen 968 - 1401) der vier Bioreaktorproben S1 - S4 sowie von *Dehalobacter restrictus*. Die Banden A und B sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die 16S rDNA der Banden A-S4 und B-S4 wurde aus dem Gel extrahiert, reamplifiziert und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe 3.4.2). Die Banden innerhalb des schwarzen Rahmens sind anhand ihrer Farbintensität quantifiziert worden (Abb. 3.10).

Tab. 3.4 Sorenson-Indizes (C_S) der Proben S1 - S4 nach DGGE-Analyse.

Probe	S1	S2	S3	S4
S1	1			
S2	0.55	1		
S3	0.35	0.62	1	
S4	0.37	0.63	0.90	1

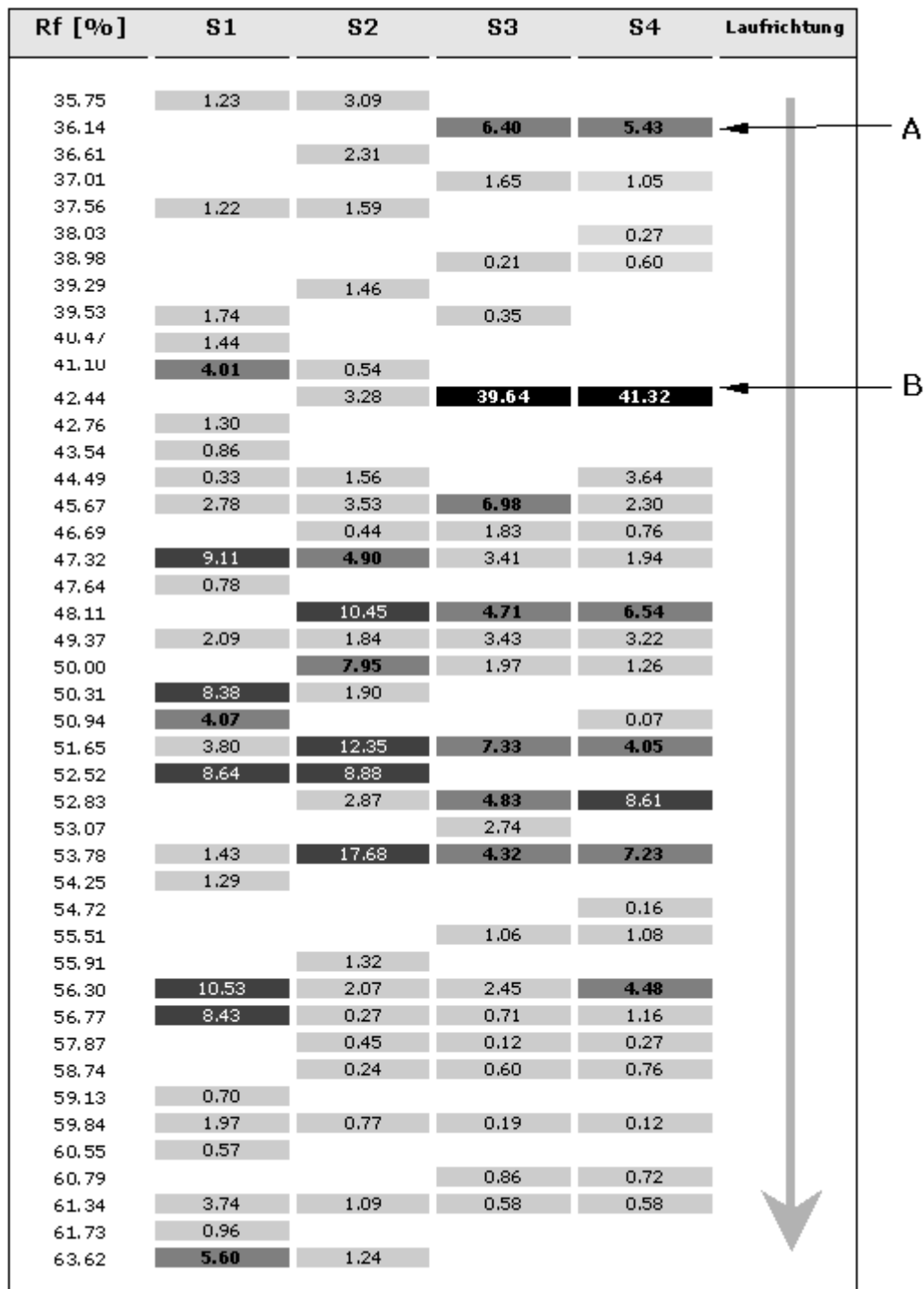


Abb. 3.10 Schematische Darstellung des in Abb. 3.9 mit einem schwarzen Rahmen gekennzeichneten Gelbereichs. Die DGGE-Banden wurden identifiziert und anhand ihrer Farbintensität quantifiziert. Die grau hinterlegten Zahlenwerte (S1 - S4) geben die relative Intensität einer Bande in Bezug zur Gesamtintensität des Probenprofils an (relative Abundanz, rA). Die Graustufe entspricht der jeweiligen Bandenintensität (rA = 0-4: 25% grau; rA = 4.01-8: 50% grau; rA = 8.01-20: 75% grau; rA ≥ 20.01: schwarz). Die Buchstaben A und B kennzeichnen die Bandenprofile, deren 16S rDNA sequenziert wurde (siehe 3.4.2). Der Rf-Wert (relative Mobilität) beschreibt die im Gel zurückgelegte Distanz bezogen zur Startlinie.

Neben der qualitativen Auswertung von Bandenmustern bietet die DGGE durch Messung der Farbtintensität der Banden die Möglichkeit zur semi-quantitativen Analyse der aufgetrennten 16S rDNA. Die Farbtintensität jeder DGGE-Bande wird dabei als Verhältnis zur Gesamt-Farbtintensität des betreffenden Profils angegeben (relative Abundanz einer Bande, rA). Die rA -Werte der Mehrzahl aller 16S rDNA-Banden sind in Abb. 3.10 wiedergegeben. Hier wurden die Banden eines zentralen Gelausschnitts anhand ihrer Farbtintensitäten bzw. Laufweiten (R_f -Werte) schematisch dargestellt. In 9 Fällen lassen sich Banden der gleichen Laufweite in allen vier Reaktorproben nachweisen. Anhand der rA -Werte können Ab- und Zunahme der korrespondierenden 16S rDNA verfolgt werden. Die höchsten rA -Werte wurden bei den Banden B-S3 sowie B-S4 ermittelt. Hier betrug rA etwa 40 und ist damit über 12 mal höher als der durchschnittliche rA -Wert aller anderen Banden ($rA_{\text{Mittel}} = 3.3$). Der Vergleich der Banden B-S2 und B-S3 zeigte darüber hinaus, daß die Bandenintensität in diesem Zeitraum um den Faktor 12 anstieg.

3.4.2 Analyse ausgewählter DGGE-Banden

Die *Dehalobacter restrictus*-Bande befand sich auf gleicher Höhe mit den Banden B-S3 und B-S4 (siehe Abb. 3.9). Auch bei Probe S2 war eine Bande an gleicher Position erkennbar. Um die Identität dieser Banden zu überprüfen, wurde die Bande B-S4 ausgeschnitten und sequenziert. In gleicher Weise wurde mit einer zweiten dominanten Bande (A-S4) verfahren. Die Untersuchung weiterer Banden gestaltete sich als schwierig, da ein kontaminationsfreies Ausschneiden durch die kurzen Abstände zwischen den einzelnen Banden nicht gewährleistet war.

Die 16S rDNA-Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert, reamplifiziert und in *E. coli* kloniert. Diese aus der DGGE-Analyse resultierenden Klone wurden als SHE-Klone bezeichnet. Die Sequenzanalyse von sieben Klonen aus Bande B-S4 ergab in sechs Fällen (Klone SHE-146 bis SHE-151) eine Sequenzähnlichkeit von $\geq 99.8\%$ zur 16S rDNA von *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA (Wild et al., 1996) (Abb. 3.11). Klon SHE-145 war phylogenetisch über 18% von *Dehalobacter restrictus* entfernt, gruppierte aber innerhalb der Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. SHE-145 wies die höchste 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit (90.1%) zum Wurtsmith-Klon WCHB1-71 (Dojka et al., 1998) auf. Die 16S rDNA-Inserts der acht analysierten SHE-Klone (SHE-133 bis SHE-140) aus DGGE-Bande A-S4 waren deutlich heterogener und konnten vier unterschiedlichen bakteriellen Phyla zugeordnet werden (Abb. 3.11). Dabei wies die 16S rDNA von Klon SHE-137 eine Sequenzähnlichkeit von 93.2% zu Klon SHA-114 bzw. 92.0% zu Klon SIC.7255 auf und gehörte damit zu dem neu definierten bakteriellen Phylum Saale-3 (siehe 3.3.2). Vier der acht analysierten SHE-Klone gehörten zu den GNS und zeigten eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu *Dehalococcoides ethenogenes* (Maymó-Gatell et al., 1997) und zum Isolat CBDB1 (Adrian et al., 2000). Beide Mikroorganismen

dechlorieren chlororganische Verbindungen reduktiv. Die Klone SHE-134 bis SHE-136 zeigten über 97% 16S rDNA-Sequenzähnlichkeit zu diesen beiden halorespirierenden Organismen.

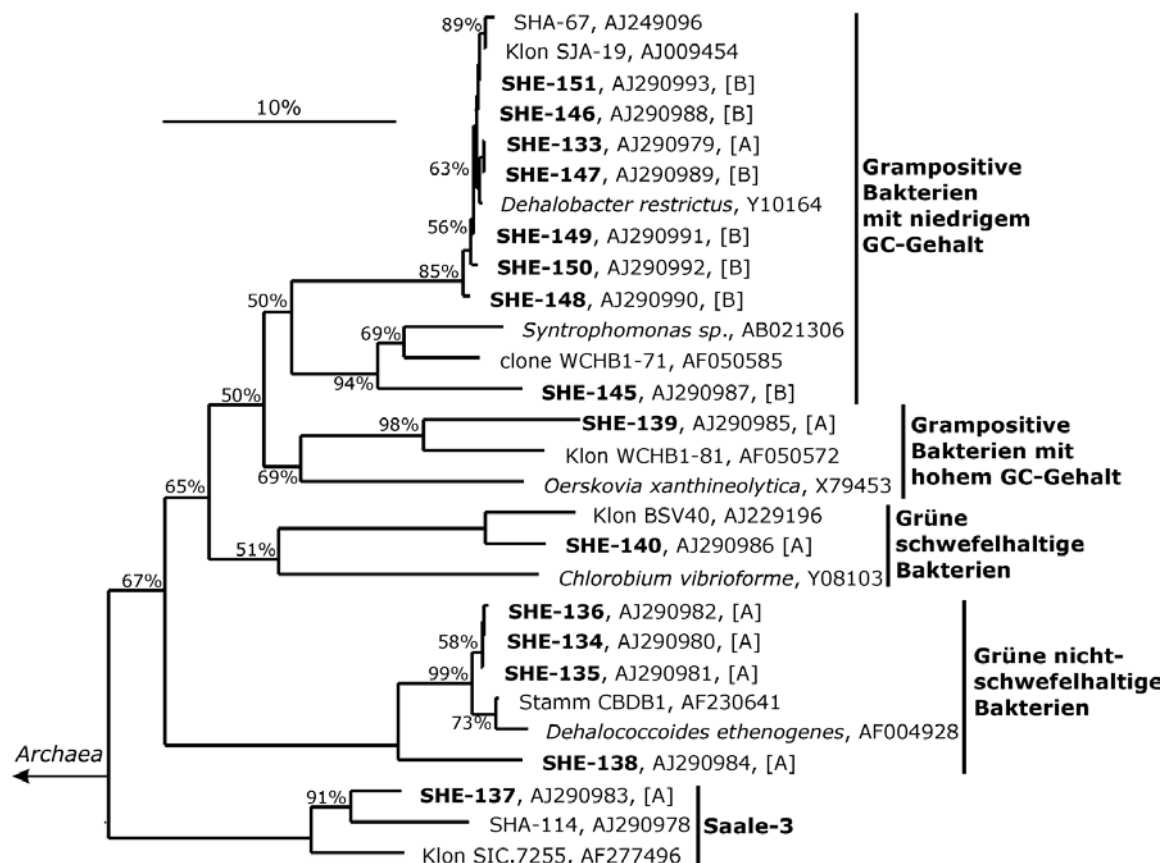


Abb. 3.11 Phylogenetische Verwandtschaft der DGGE-Klone (SHE-Klone) zu veröffentlichten 16S rDNA-Sequenzen. Mit [A] und [B] sind die entsprechenden DGGE-Bandenprofile angegeben (siehe Abb. 3.9 bzw. 3.10). Bakterielle Phyla sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode konstruiert. Die 16S rDNA-Sequenz von *Methanomethylovorans hollandica* (AF120163) wurde als Außengruppe gewählt. Die Zuverlässigkeit des Verzweigungsmusters wurde durch eine Bootstrapanalyse mit 1000-facher Replikation geprüft. Die Verzweigungswahrscheinlichkeiten sind durch Prozentangaben dargestellt. Die Summe der horizontalen Astlängen repräsentiert die phylogenetische Distanz zwischen den einzelnen 16S rDNA-Sequenzen.

3.5 Analyse der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch QE-PCR

Mit Hilfe der QE-PCR wurden 16S rDNA Konzentrationen in den vier Bioreaktorproben S1 bis S4 gemessen, um die relative Häufigkeit von *Dehalobacter restrictus* abschätzen zu können. Durch die Verwendung entsprechender Primerkombinationen wurde die 16S rDNA-Konzentration von *Dehalobacter restrictus* bestimmt und im Vergleich zur Gesamt-16S rDNA-Konzentration ausgewertet. Während zur Messung der 16S rDNA-Konzentration der Bakterien auf etablierte Primer (TPU1 und RTU8) zurückgegriffen werden konnte, mußte zur Amplifizierung von *Dehalobacter*-16S rDNA ein neues Primerpaar entwickelt werden. Basierend auf den Sequenzdaten der *Dehalobacter*-identischen SHA- bzw. SHD-Klone sowie auf den entsprechenden in Datenbanken hinterlegten Sequenzen wurde das Primerpaar deb179f/deb1007r abgeleitet, mit dem ein etwa 800 bp langes 16S rDNA-Fragment amplifiziert wurde. Zur Überprüfung der Amplifizierungsspezifität wurde DNA von *Clostridium symbiosum* sowie *Sulfospirillum barnesii* als Negativkontrolle eingesetzt.

Die QE-PCR im LightCycler wurde im sog. „SYBR-Green I Format“ durchgeführt. Bei diesem Ansatz enthält der PCR-Reaktionsansatz den fluoreszierenden Farbstoff SYBR-Green I, der sich selektiv in doppelsträngige DNA einlagert. Der LightCycler mißt während der PCR-Reaktion die Zunahme des Amplifikationsprodukts durch den damit verbundenen Anstieg der Fluoreszenzemission von SYBR-Green I. Wird parallel zur DNA aus der zu untersuchenden Probe DNA aus einer Verdünnungsreihe amplifiziert, so kann aus den jeweiligen Reaktionskinetiken die Ausgangskonzentration der Proben-DNA ermittelt werden.

Zunächst wurden die PCR-Reaktionen unter Verwendung des DNA-Master SYBR-Green I Kits in einem herkömmlichen PCR-Gerät optimiert, um die Eignung sowohl des Kits als auch des neuen Primerpaares deb179f/deb1007r zur Amplifizierung bakterieller bzw. *Dehalobacter*-identischer 16S rDNA aus den Bioreaktorproben zu prüfen. Danach erfolgte die Übertragung des PCR-Protokolls auf den LightCycler. Da sich zum einen das Temperierprinzip (Heißlufttemperierung) und zum anderen die Reaktionsgefäße (transparente Kapillaren) des LightCyclers im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Verfahren unterscheiden, waren Änderungen im Reaktionsprotokoll erforderlich. Es zeigte sich, daß der Zusatz von Dimethylsulfoxid und zusätzlichem Magnesiumchlorid sowie eine Verringerung der Temperatursteigerungsrate eine erfolgreiche Amplifizierung bakterieller und *Dehalobacter*-identischer 16S rDNA ermöglichte.

In Abb. 3.12 sind die mit Hilfe des LightCyclers ermittelten Kinetiken der 16S rDNA-Amplifikationen aus den Bioreaktorproben S1 bis S4 bzw. aus den entsprechenden Verdünnungsreihen dargestellt. Aus den Kinetiken der definierten DNA-Verdünnungsreihen wurden spezifische Kalibriergeraden für jeweils eine der beiden

Primerkombinationen erstellt (Abb. 3.12). In beiden Fällen betrug der Regressionskoeffizient mehr als 0.98, so daß eine hinreichende Linearität der Kalibriergeraden gewährleistet war.

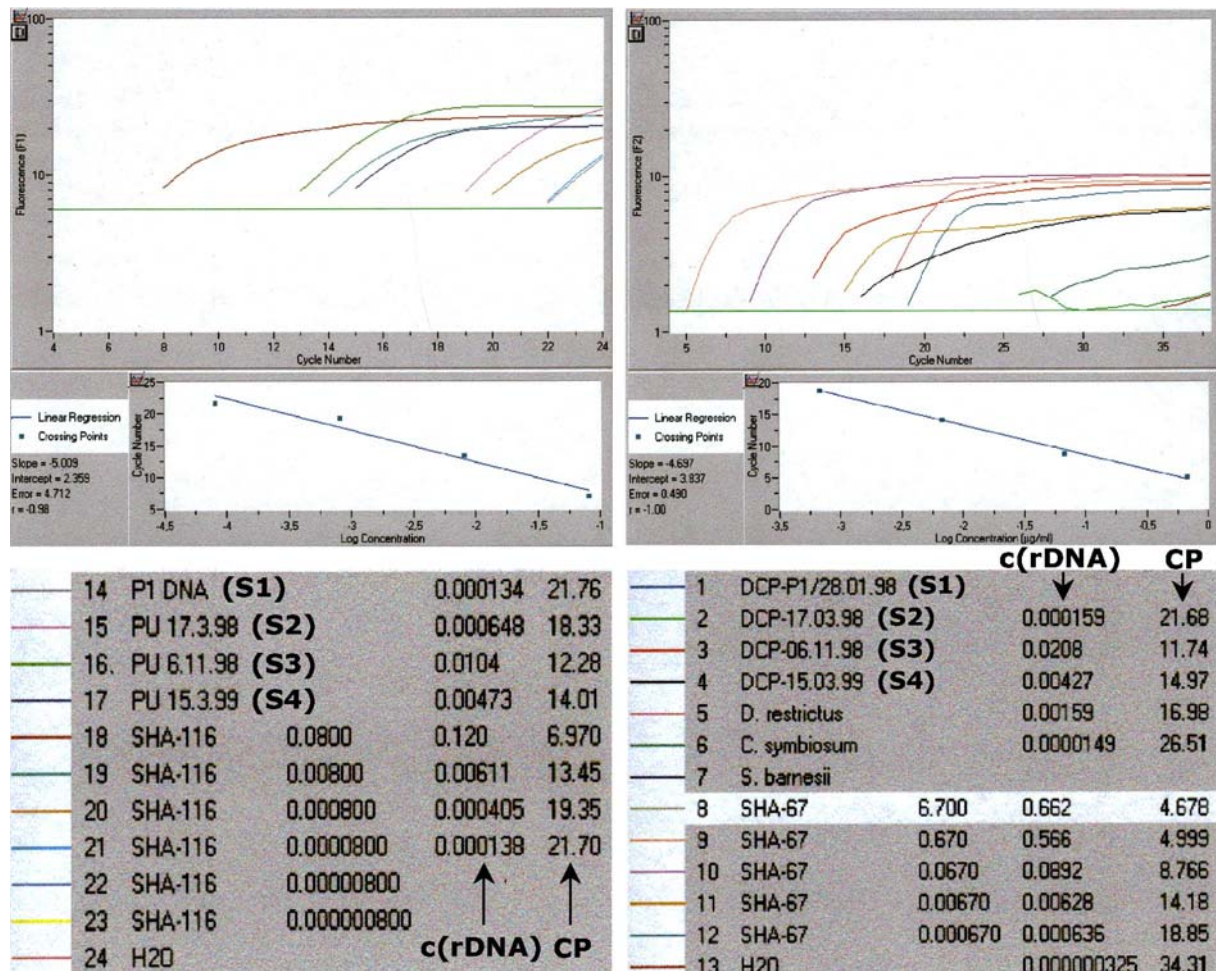


Abb. 3.12 Quantifizierung bakterieller (linker Teil) sowie *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher (rechter Teil) 16S rDNA in den Proben S1 –S4 mittels QE-PCR im LightCycler. Im oberen Teil der Abbildung sind die Reaktionsverläufe (Fluoreszenzemissionen vs. Zahl der PCR-Zyklen) in halblogarithmischer Auftragung dargestellt. Die grüne Linie („Noise-Band“) grenzt verwertbare Meßpunkte von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz ab. Aus den Kinetiken der Verdünnungsreihen wurden Kalibriergeraden erstellt, mit deren Hilfe die 16S rDNA-Konzentrationen der Proben ermittelt werden konnten. CP (Crossing Point) bezeichnet den Beginn der exponentiellen Amplifikation.

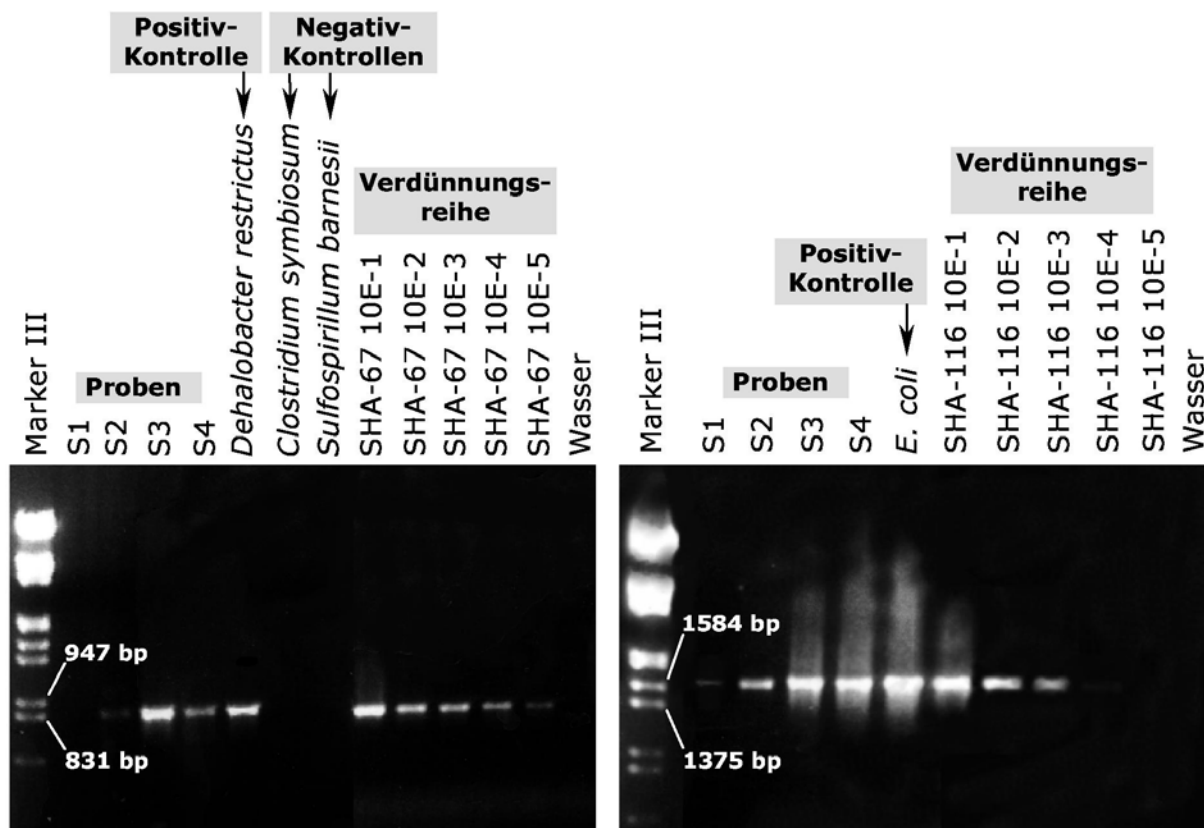


Abb. 3.13 Elektrophoretische Auftrennung der im LightCycler erzeugten PCR-Produkte im Agarosegel (1%). Linkes Bild: *Dehalobacter restrictus*-spezifische Primer; rechtes Bild: *Bacteria*-spezifische Primer.

Tab. 3.5 Quantifizierung bakterieller und *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher 16S rDNA mittels QE-PCR. In Probe S3 wurden die höchsten 16S rDNA-Konzentrationen gemessen (*Dehalobacter*- und *Bacteria*-spezifische Primer). Diese Werte repräsentieren jeweils 100%. Auf diese Weise können die Konzentrationsänderungen innerhalb der Proben miteinander verglichen werden.

Probe	16S rDNA-Konzentration <i>D. restrictus</i> -spezifische Primer		16S rDNA-Konzentration Bakterien-spezifische Primer	
	[ng/mL]	[%]	[ng/mL]	[%]
S1	nicht nachweisbar	-	0.14	1.34
S2	0.16	0.77	0.65	6.22
S3	20.80	100.00	10.45	100.00
S4	4.27	20.53	4.73	45.26

Eine der Hauptfehlerquellen der Echtzeit-PCR im LightCycler liegt in der Entstehung von Primer-Dimeren. Diese zusammengelagerten Primermoleküle verfälschen die Messung der Fluoreszenzemissionen amplifizierter DNA und sind anhand der Reaktionskinetiken nicht eindeutig zu erkennen. Aus diesem Grunde wurden zur Kontrolle die im LightCycler amplifizierten PCR-Produkte einer Agarosegelelektrophorese unterzogen (Abb. 3.13). Die nach der Ethidiumbromidfärbung erhaltenen 16S rDNA-Banden bestätigten qualitativ die Ergebnisse des LightCyclers. Bakterielle 16S rDNA war aus allen 4 Reaktorproben amplifizierbar. Der Anteil *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher 16S rDNA hingegen lag in Probe S1 unterhalb der Nachweisgrenze. Basierend auf den Werten der Kalibriergraden konnten die Konzentrationen bakterieller sowie *Dehalobacter*-identischer 16S rDNA berechnet werden (Tab. 3.5). Der Gehalt bakterieller 16S rDNA nahm von Probe S2 zu Probe S3 um den Faktor 16 zu. Im gleichen Zeitraum stieg die Konzentration der *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen 16S rDNA 130-fach, d.h. um etwa eine Größenordnung (8-fach) stärker als die der gesamten Bakterien. Von Probe S3 zu S4 kam es zu einem leichten Rückgang des 16S rDNA-Gehalts. Die *Dehalobacter restrictus*-spezifische rDNA nahm dabei doppelt so stark ab, wie die bakterielle rDNA.

3.6 Nachweis von Bakterien und Archaea der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch FISH

Basierend auf der Analyse der Klonbibliotheken A – D wurden insgesamt neun Klone ausgewählt, die mit Hilfe der FISH in den Bioreaktorproben S1 – S6 nachgewiesen werden sollten (Tab. 3.6). Dazu mußten im rechnergestützten Verfahren fünf neue 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden abgeleitet werden, deren Spezifität durch Vergleich mit über 20000 16S rRNA-Datenbankeinträgen überprüft wurde. Neben den Hybridisierungen mit gattungs- bzw. speziesspezifischen Sonden wurden auch Versuche mit den universellen Sonden EUB338^{Cy3} sowie ARCH915^{Cy3} durchgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotidsonden waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin3 (Cy3) markiert, der bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 550 nm zu einem roten Farbeindruck führt (Emissionswellenlänge von 570 nm) (Moter und Göbel, 2000). Zusätzlich wurde das Probenmaterial parallel zur FISH mit DAPI gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert selektiv in DNA und läßt DNA-enthaltende Zellen bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 345 nm blau erscheinen (Emissionswellenlänge von 450 nm).

Tab. 3.6 Zusammenfassung der für die FISH verwendeten Oligonukleotidsonden.

Oligonukleotid	Spezifität ¹	Phylum / Phylum Cluster
a21 ^{Cy3}	SHA-21	GNS
a24 ^{Cy3}	SHA-24, SHA-56, Klon WCHB1-43	GNS
a25 ^{Cy3}	SHA-25	<i>Cytophaga-Bacteroides-Flexibacter</i>
deb179 ^{Cy3}	SHA-67, SHD-11, Klon SJA-19, <i>Dehalobacter restrictus</i>	Grampositive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt
MHOLL ^{Cy3}	SHB-143, SHC-10 <i>Methanomethylovorans hollandica</i> , <i>Methanomethylovorans victoriae</i>	<i>Euryarchaeota</i>
MCONC ^{Cy3}	SHB-23, SHC-216, <i>Methanosaeta</i> <i>concilii</i> , <i>Methanosaeta concilii</i> - ähnliche Klone bzw. Isolate ²	<i>Euryarchaeota</i>
EUB338 ^{Cy3}	<i>Bacteria</i>	-
ARCH915 ^{Cy3}	<i>Archaea</i>	-

¹ Datenbankabgleich wurde im Januar 2001 durchgeführt.

² Diese Klone bzw. Isolate sind im Anhang in Tab. 6.1 zusammengefaßt

Aufgrund der Beschaffenheit des Probenmaterials gestaltete sich die Durchführung der FISH als schwierig. Im Falle der Objektträgerproben führte lediglich die FISH von Probe S2 zu auswertbaren Ergebnissen. Die Hybridisierung des Biofilms mit der Sonde ARCH915^{Cy3} zeigte eine Vielzahl von Zellen überwiegend gleicher charakteristischer Morphotypen (relativ große, oftmals in Paketen zusammengelagerte Kokken; Abb. 3.14). Eine solche Morphologie wurde auch für *Methanomethylovorans hollandica* beschrieben (Lomans et al., 1999).

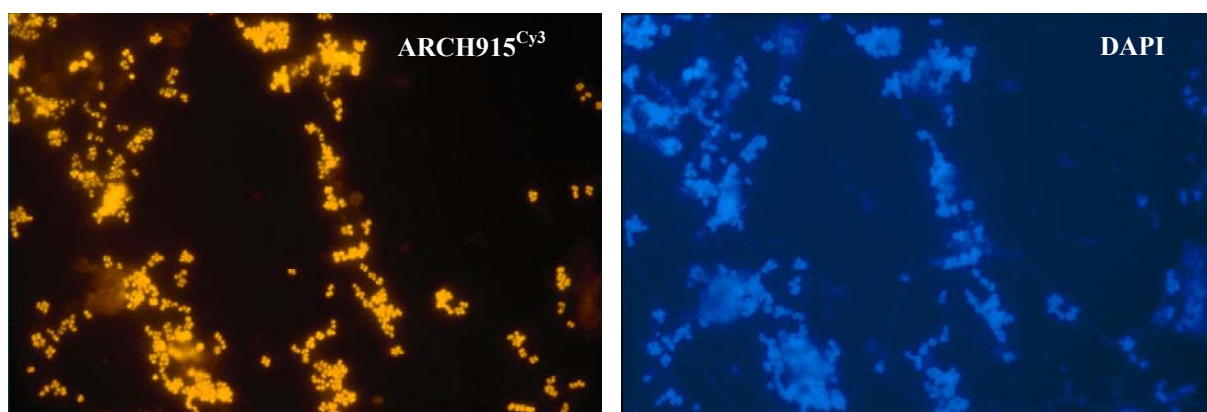


Abb. 3.14 Mikroskopische Auswertung der FISH sowie der DAPI-Färbung von Probe S2 (Objektträger). Linkes Bild: Sonde ARCH915^{Cy3}, rechtes Bild: DAPI.

Parallel zur Hybridisierung mit ARCH915^{Cy3} reagierten die Zellen ebenfalls mit DAPI (Abb. 3.14). Die Hybridisierung des Biofilms mit der Sonde EUB338^{Cy3} war hingegen negativ. Die nachfolgenden Objektträgerproben (S3 - S6) bewuchsen mit zunehmender Kultivierungsdauer der Population immer dichter, so daß einzelne Zellen des Biofilms mikroskopisch nicht eindeutig diskriminierbar waren.

Bei den PU-Proben wurde zunächst versucht, die in Form eines dichten Biofilms wachsenden Mikroorganismen durch starkes Schütteln ("Vortexing") von der Kunststoffoberfläche abzulösen. Auf diese Weise entstanden jedoch nur kleinere „Biofilmflocken“, d.h. Aggregate aus einer Vielzahl von Mikroorganismen und der sie zusammenhaltenden Polysaccharidmatrix. Die FISH-Versuche mit diesen Biofilmflocken führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Um den Biofilm der PU-Körper mit Hilfe der FISH untersuchen zu können, wurde in Anlehnung an die Arbeit von Zarda et al. (1997) ein Protokoll zur Vorbehandlung der Proben etabliert. Diese Vorbehandlung erlaubte ein Lösen der Mikroorganismen aus dem Biofilm bei hinreichendem Erhalt der Zellintegrität. Zunächst wurden die derart konditionierten Biofilmproben (S1 - S6) mit den universellen Sonden EUB338^{Cy3} sowie ARCH915^{Cy3} hybridisiert sowie mit DAPI gefärbt. Während mit der bakteriellen Sonde trotz Vorbehandlung keine eindeutigen Ergebnisse zu erzielen waren, konnten *Archaea* in allen Proben in großer Zahl gefunden werden. Wieder dominierten die bereits in der Probe S2 (Objektträger) nachgewiesenen *Methanomethylovorans*-ähnlichen Zellen (Abb. 3.15). Zusätzlich wurden positive Hybridisierungssignale von *Archaea* mit *Methanosaeta concilii*-charakteristischen Morphotypen gefunden (Abb. 3.15). Die DAPI-Färbung ließ neben den *Methanomethylovorans*- und den *Methanosaeta*-ähnlichen Zellen eine Vielzahl anderer Morphotypen erkennen, die jedoch vergleichsweise klein waren.

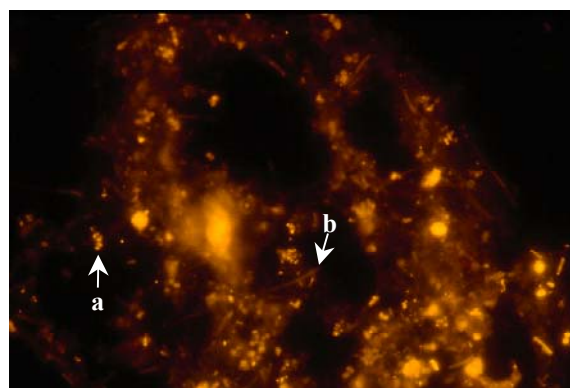


Abb. 3.15 Mikroskopische Auswertung der FISH von Probe S5 (PU-Partikel) mit der Sonde ARCH915^{Cy3}. a: *Methanomethylovorans*-ähnlicher Morphotyp, b: *Methanosaeta*-ähnlicher Morphotyp.

Nach den Hybridisierungen mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden sollten einige der in den Klonbibliotheken A - C gefundenen Bakterien sowie *Archaea* durch Verwendung von gattungs- bzw. speziesspezifischen Oligonukleotiden in situ nachgewiesen werden. Trotz entsprechender Vorbehandlung der Bioreaktorproben sowie niedriger Stringenzbedingungen blieben alle Versuche, die in Tab. 3.6 aufgeführten bakteriellen Mikroorganismen mit Hilfe der FISH zu erfassen, erfolglos. Oftmals waren die erzielten Ergebnisse uneindeutig, d.h. es gab zwar ein Fluoreszenzsignal einer jeweiligen Sonde, jedoch kein korrespondierendes Signal der parallel durchgeführten DAPI-Färbung. Die im Falle der *Dehalobacter*-spezifischen Sonde deb179^{Cy3} vorhandene Positivkontrolle (*Dehalobacter retriectus*, DSM 9454) lieferte ein eindeutiges Ergebnis (Abb. 3.16), so daß deb179^{Cy3} zur FISH von Bakterien der Gattung *Dehalobacter* geeignet war. Bei den Sonden a21^{Cy3}, a24^{Cy3} sowie a25^{Cy3} waren Positivkontrollen nicht verfügbar, da die korrespondierenden Bakterien bislang nicht kultiviert worden waren.

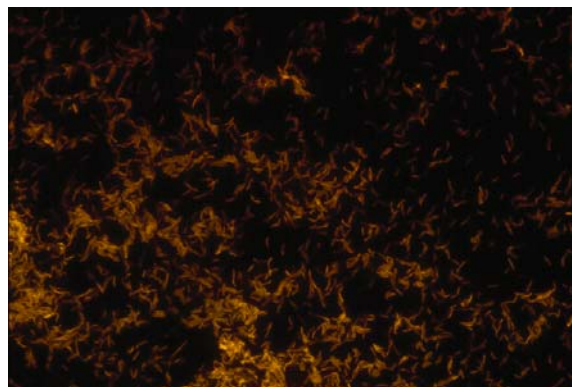


Abb. 3.16 Mikroskopische Auswertung der FISH von *Dehalobacter retriectus* mit der Sonde deb179^{Cy3}.

Anders hingegen stellte sich die Situation im Falle der Oligonukleotidsonden MHOLL^{Cy3} sowie MCONC^{Cy3} dar. Die Hybridisierungen führten in allen Proben zu positiven Ergebnissen (Abb. 3.17). Die Spezifität der Versuche wurde durch das Mitführen geeigneter Negativ- und Positivkontrollen (siehe 2.5) sowie durch hohe Stringenzbedingungen (46°C, 60% Formamid) gewährleistet. *Methanosaeta concilii* war aufgrund der charakteristischen Zellform auch im Phasenkontrastbild leicht erkennbar (Abb. 3.18).

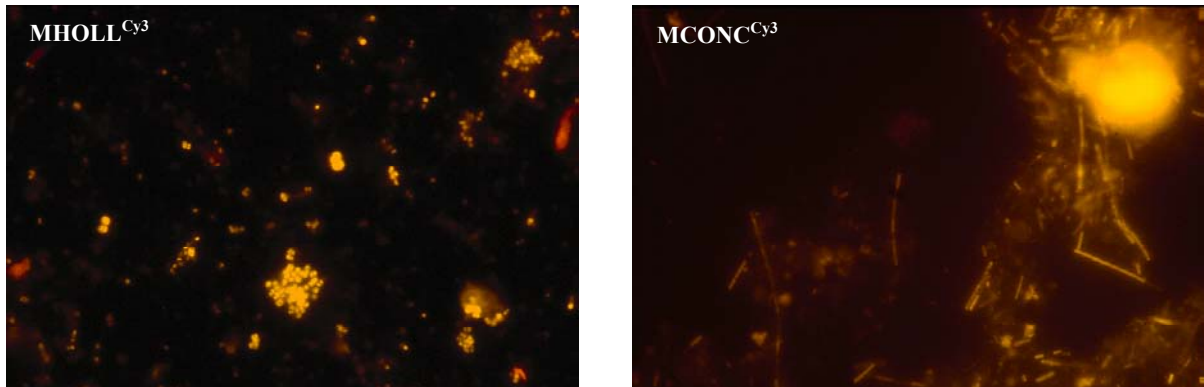


Abb. 3.17 Mikroskopische Auswertung der FISH. Linkes Bild: Probe S3 (PU-Partikel), Sonde MHOLL^{Cy3}; rechtes Bild: Probe S6 (PU-Partikel), Sonde MCONC^{Cy3}.

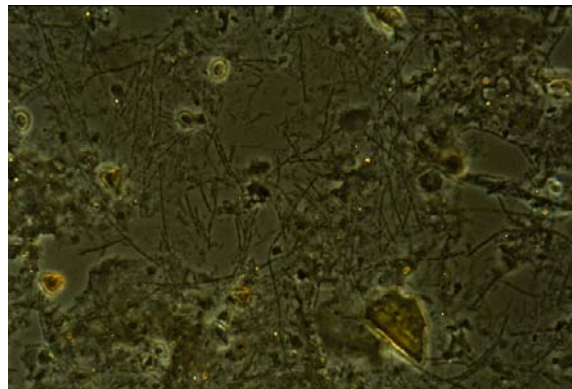


Abb. 3.18 Mikroskopische Auswertung der Probe S6 (PU-Partikel) im Phasenkontrast.

Zum Ausschluß von Autofluoreszenz (zur Übersicht s. Moter und Göbel, 2000), wurden FISH-Protokolle ohne Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotidsonden bzw. DAPI durchgeführt. Bei diesen Kontrollversuchen wiesen lediglich einige „Partikel“ Eigenfluoreszenz auf, die durch ihre Form und Gestalt eindeutig von Mikroorganismen abgegrenzt werden konnten.

3.7 DCP-Dechlorierung der Bioreaktorpopulation nach Zugabe von Wasserstoff

Um den Einfluß von Wasserstoff auf die DCP-Transformation der Bioreaktorkultur zu untersuchen, wurden zwischen Tag 769 und 785 des Reaktorbetriebs (08.02. – 24.02.2000) täglich zur gleichen Zeit 200 mL gasförmiger Wasserstoff in den Zulauf des Reaktors gegeben. Daraufhin stieg die DCP-Transformationsrate innerhalb eines Zeitraums von zwei Tagen um etwa 45% (Abb. 3.19). Nach 16 Tagen wurde die Zufuhr von Wasserstoff beendet. Die DCP-Transformationsrate nahm als Folge wieder ihren ursprünglichen Wert an.

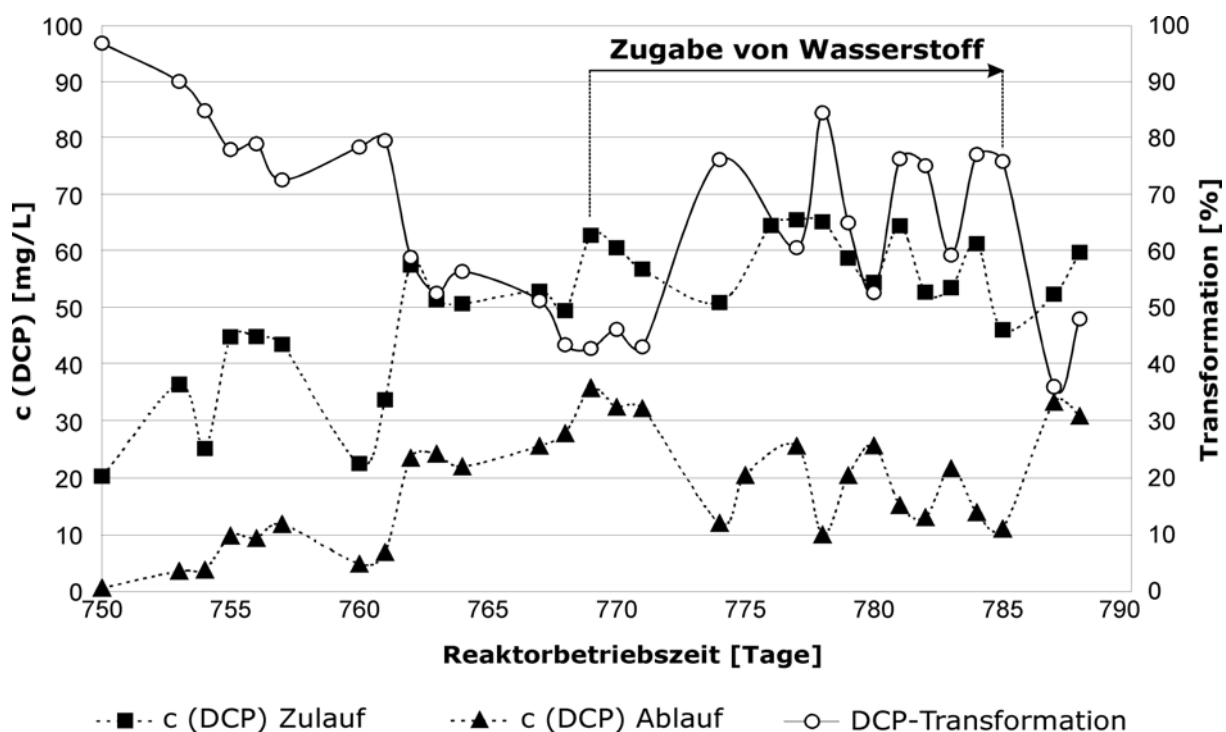


Abb. 3.19 Veränderung der mikrobiellen DCP-Transformation im Bioreaktor nach Zugabe von Wasserstoff. Die relativ stark fluktuierende Transformationsrate läßt sich auf die Art der Wasserstoffzugabe zurückführen (Einzeldosierungen).

4 Diskussion

4.1 Mikrobielle Diversität der DCP-dechlorierenden Population

4.1.1 Methodischer Ansatz

In natürlichen Lebensräumen werden Mikroorganismen überwiegend in Form komplexer Populationen gefunden, die sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Arten zusammensetzen. Die mikrobielle Diversität solcher Populationen wird dabei wesentlich durch die jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen, die Gesamtheit des genetischen Pools sowie die ökologische Rolle der beteiligten Mikroorganismen charakterisiert. Innerhalb dieser Lebensräume unterliegen die Mikroorganismen den chemisch-physikalischen Veränderungen der sie umgebenden Umwelt sowie den Einflüssen durch physiologische und metabolische Prozesse der gesamten Mikroflora. Die oftmals unzureichende Kenntnis dieser natürlichen Interaktionen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften erschweren die in-vitro-Kultivierung bzw. -Isolierung der beteiligten Mikroorganismen, da die notwendigen physiologischen Rahmenbedingungen nicht simuliert werden können. Aus diesem Grunde ist bisher ein nur relativ kleiner Teil der in der Umwelt vorkommenden Bakterien und Archaea als in-vitro-Reinkultur verfügbar (etwa 1 – 5%; Hunter-Cevera et al., 1998). Da für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität eines komplexen Lebensraums herkömmliche Kultur- und Identifizierungsverfahren allein offenbar nicht ausreichen, muß stattdessen ein experimentelles Vorgehen gewählt werden, das die Gesamtheit aller Mikroorganismen, d.h. kultivierte wie auch bislang nicht-kultivierte, zu erfassen vermag. Die Verwendung molekulargenetischer Techniken, wie die in-vitro-Amplifikation, Klonierung oder Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten, ermöglicht eine solche kulturunabhängige Charakterisierung komplex zusammengesetzter mikrobieller Populationen. Seit den grundlegenden Arbeiten von Carl Woese und Mitarbeitern (zur Übersicht s. Woese, 1987) werden vor allem ribosomale Ribonukleinsäuren bzw. deren kodierenden Gene als molekulare Marker zur Typisierung oder phylogenetischen Klassifizierung von Mikroorganismen eingesetzt. Aufgrund ihrer Schlüsselposition in der Proteinsynthese sind diese Moleküle ubiquitär verbreitet und besitzen eine weitgehend konservierte Struktur. In der Primärstruktur wechseln sich stark konservierte Bereiche, die bei der überwiegenden Zahl der Mikroorganismen identisch sind, mit weniger stark bis kaum konservierten Bereichen ab. Letztere variable Bereiche weisen meist ausreichende Sequenzunterschiede zur Diskriminierung einzelner mikrobieller Spezies auf. Oligonukleotidprimer, die gegen stark konservierte Bereiche der rRNA-Gene gerichtet sind, erlauben die PCR-Amplifikation und anschließende Klonierung der rDNA nahezu aller Bakterien und Archaea. Da die universelle Amplifikation mikrobieller rDNA auch die

Analyse von Mikroorganismen ermöglicht, die nicht als in-vitro-Reinkultur vorliegen, hat dieser methodische Ansatz zu grundlegend neuen Erkenntnissen bei der Beschreibung mikrobieller Diversität in komplexen Ökosystemen geführt (Göbel, 1995). Untersuchungen in einer Vielzahl unterschiedlichster mikrobieller Lebensräume, wie etwa Böden (Weber et al., 2001), heißen Quellen (Hugenholtz et al., 1998a), Belebtschlamm (Schuppler et al., 1995), Seesediment (Hastings et al., 1998) usw., zeigten, daß die mikrobielle Diversität solcher Habitate weitaus höher ist, als bislang angenommen. Darüber hinaus wurde deutlich, daß sich die Mehrzahl mikrobieller Lebensgemeinschaften nahezu vollständig aus bisher unbekannten, nicht-kultivierten Bakterien bzw. Archaea zusammensetzen. Zahlreiche dieser lediglich anhand ihrer rDNA-Sequenz charakterisierten Mikroorganismen sind phylogenetisch mit bereits bekannten Mikroorganismen verwandt und lassen sich bestehenden Taxa zuordnen. Nicht selten jedoch repräsentieren rDNA-Sequenzen bislang unkultivierte Mikroorganismen neuer Taxa für die bisher keine oder nur wenige kultivierte Vertreter beschrieben wurden (Hugenholtz et al., 1998b).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Daten zur mikrobiellen Diversität CKW-transformierender mikrobieller Populationen in der Literatur vor. Daher wurde die DCP-dechlorierende Bioreaktorpopulation zunächst durch Anlage und Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken charakterisiert. Dieser methodische Ansatz ermöglicht eine hohe Auflösung sowie das Auffinden bislang unbekannter Mikroorganismen. Von dieser Herangehensweise unterscheidet sich der sogenannte „top-to-bottom-approach“ (Amann et al., 1995). Hier werden gruppenspezifische 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden, die mikrobielle Taxa unterschiedlicher Hierarchien erfassen, in der FISH eingesetzt. Dieser Ansatz ermöglicht zwar eine deutlich schnellere Analyse mikrobieller Populationen, setzt allerdings einen zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen 16S rRNA-Datensatz als Grundlage zur Entwicklung neuer Sonden voraus. Auch eine simultane Verwendung von Sonden mit gestaffelter Spezifität (z.B. Gattungs- und Speziespezifität) gestattet folglich nur den Nachweis bekannter rRNA-Sequenzen und kann höchstens durch das Ausbleiben eines Doppelnachweises einen indirekten Hinweis auf die Anwesenheit bislang unbekannter Mikroorganismen geben. Demgegenüber ermöglicht die Verwendung hochkonservierter PCR-Amplifikationsprimer die Erfassung nahezu aller mikrobiellen 16S rDNA-Sequenzen, die durch nachfolgende Klonierung und Sequenzierung eindeutig phylogenetisch klassifiziert werden können. Aus diesem Grunde ist ein „top-to-bottom-approach“ zur Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation nur als Ergänzung, nicht aber als alleiniges Konzept der Diversitätsanalyse zu betrachten.

4.1.2 Einfluß experimenteller Faktoren auf die PCR-vermittelte Diversitätsanalyse

Bei der Anwendung molekulargenetischer Methoden zur kulturunabhängigen Diversitätsanalyse von Mischpopulationen können, wie bei jedem anderen methodischen Ansatz auch, einige Fehlerquellen zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen (zur Übersicht s. von Wintzingerode et al., 1997). Zunächst stellt die Probennahme bzw. der Probentransport von der Entnahmestelle zum Ort der Weiterverarbeitung eine potentielle Fehlerquelle dar. So zeigte der Vergleich von Diversitätsanalysen mehrerer Tiefseesedimentproben, daß unterschiedliche Lagerungen des Probenmaterials (Variation von Temperatur, Zeit und Luftsauerstoffkontakt) vor der Weiterverarbeitung zu einer signifikanten Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung führte (Rochelle et al., 1994). Aus diesem Grunde wurden die Proben aus dem DCP-dechlorierenden Bioreaktor unmittelbar nach Entnahme entweder direkt in kaltem Ethanol/PBS (mit sowie ohne Formalinzusatz) fixiert oder in einen zuvor mit Eis (-20°C) und Kälteakkus (-80°C) präparierten Thermotransportbehälter überführt.

Unabhängig von den verwendeten Methoden zur Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Population stellten die im Wirbelschichtreaktor befindlichen Aufwuchskörper der Mikroorganismen (PU-Würfel) ein spezielles Problem hinsichtlich der Probennahme dar. In einem Zweiphasensystem (flüssig-gasförmig) kann unter normalen Betriebsbedingungen eines Reaktors von einer vollständigen Durchmischung der Dispersion ausgegangen werden. Demzufolge sind auch die in der Dispersion suspendierten Mikroorganismen homogen verteilt, so daß eine Probennahme hinreichenden Volumens aus dem vollständig durchmischten Reaktorinhalt einen repräsentativen Querschnitt der mikrobiellen Flora gewährleisten würde. Beim verwendeten Dreiphasensystem hingegen (flüssig-gasförmig-fest) befand sich der Großteil aller Mikroorganismen in Form von Biofilmen an der Oberfläche der PU-Körper und ein nur relativ kleiner Teil in der flüssigen Phase. Die Entnahme eines PU-Körpers zur mikrobiellen Analyse setzte folglich die Annahme voraus, daß die einzelnen Aufwuchsflächen innerhalb der Bioreaktorkultur gleich bewachsen waren und auf diese Weise einen repräsentativen Querschnitt der im Reaktor befindlichen Mikroorganismen ermöglichten.

Für alle PCR-vermittelten Analysemethoden ribosomaler rRNA-Gene stellt das Aufbrechen der Zellen sowie die anschließende Extraktion der DNA aus dem Probenmaterial einen weiteren kritischen Schritt dar. So kann eine insuffiziente Zellysis im Rahmen der Probenaufarbeitung dazu führen, daß ein nur unvollständiges rDNA-Spektrum für die anschließende PCR-Amplifikation zugänglich wird. Auf der anderen Seite resultieren harsche Methoden des Zellaufbruchs, wie sie etwa bei grampositiven oder säurefesten Bakterien erforderlich sind, in fragmentierter DNA der gramnegativen Bakterien. Solche Nukleinsäurefragmente tragen zur Entstehung von PCR-Artefakten bei und werden speziell

für die Entstehung von Sequenzchimären verantwortlich gemacht (Liesack et al., 1991) (s. auch 3.3.5). Folglich muß eine möglichst vollständige Lysis aller beteiligten Zellen und eine schonende Behandlung der Nukleinsäuren angestrebt werden. Die sich anschließende Extraktion der DNA kann vor allem durch im Probenmaterial vorhandene biotische sowie abiotische Komponenten, z.B. anorganische Kleinstpartikel oder organische Substanzen, beeinträchtigt werden. Zur Präparation hochmolekularer DNA aus der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation wurde daher eine Kombination aus mehreren Lysis- und Extraktionsschritten gewählt (modifiziert nach Tsai und Olson, 1991). Diese Verfahrensweise hatte sich bei vergleichbaren Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe bewährt (von Wintzingerode et al., 1999; Abd El Haleem et al., 2000) und sollte zudem der Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse dienen.

Auch die Amplifikation der 16S rDNA aus der präparierten Proben-DNA unterliegt zahlreichen Einflüssen, die zu einer fehlerhaften Bestimmung mikrobieller Diversität führen können. So wurden beispielsweise die rDNA-Amplifikationen der Bioreaktorproben S1 bis S4 durch koextrahierte Substanzen (z.B. Huminsäuren) inhibiert, die erst durch einen zusätzlichen Gelfiltrationsschritt beseitigt werden konnten. Ein weiteres PCR-Phänomen sind Sequenzchimären, die bereits im oberen Teil dieses Abschnitts Erwähnung fanden. Diese PCR-Artefakte können sowohl durch Amplifikation fragmentierter DNA als auch durch unvollständige Strangsynthesen während der PCR-Elongation gebildet werden und sind aus der rDNA zweier Mikroorganismen zusammengesetzt. Ein weiterer Fehler bei jeder Amplifikation gemischter, für homologe Gene kodierender DNA ist die Bildung von Heteroduplex-Molekülen (Qiu et al., 2001), bei der es zur Zusammenlagerung zweier nicht-komplementärer DNA-Stränge kommt. Wird eine rDNA-Heteroduplex kloniert bzw. transformiert, entstehen zwei homoduplexe rDNA-Moleküle, die infolge der Plasmidvermehrung voneinander getrennt und weitergegeben werden. Auch durch fehlerhafte Replikation eingeführte Mutationen können zu einer Verfälschung der Diversitätsanalyse beitragen. Deletionsmutanten treten auf, wenn das zu amplifizierende Molekül, wie etwa das rRNA-Gen, über eine ausgeprägte Sekundärstruktur verfügt. Punktmutationen werden durch Basenfehlinkorporationen der verwendeten DNA-Polymerasen verursacht.

In einem kürzlich erschienenen Aufsatz wurde eine systematische Untersuchung des Einflusses von PCR-Bedingungen auf die Entstehung von PCR-Artefakten vorgestellt (Qiu et al., 2001). Anhand ihrer experimentellen Daten schlußfolgerten die Autoren, daß möglichst wenige Amplifikationszyklen, eine möglichst lange Elongationsphase sowie die Verwendung von *AmpliTaq* DNA-Polymerase die Formation der wenigsten PCR-Artefakte zur Folge hat. Diesen Kriterien wurde im Rahmen dieser Untersuchung Rechnung getragen. Einen Hinweis auf die Entstehung relativ weniger PCR-Artefakte lieferte die Überprüfung des rDNA-Datensatzes auf chimäre Sequenzen. So wurden mit Hilfe des CHECK-CHIMERA-Programms bei insgesamt 170 sequenzierten SHA-, SHB-, SHC- bzw.

SHD-Klonen nur vier Klone als Sequenzchimären identifiziert (etwa 2%). In vergleichbaren Untersuchungen komplexer Habitats wurden Sequenzchimären zwischen 2 und 9% nachgewiesen (Choi et al., 1994; Godon et al., 1997; von Wintzingerode et al., 1999). Neben den sinnvoll gewählten PCR-Bedingungen wirkte sich vermutlich auch die Verwendung hochmolekularer Ausgangs-DNA zur Amplifikation mikrobieller 16S rDNA positiv auf das Ausbleiben von Sequenzchimären aus. Allerdings ist die Identifizierung einer Chimäre mit CHECK-CHIMERA dann als unsicher zu betrachten, wenn nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu den vorhandenen 16S rDNA-Datenbankeinträgen vorliegen (Hugenholtz et al., 1998a). Da dies bei einem Großteil der ermittelten SHA- sowie SHD-Klonsequenzen der Fall war, wurden zusätzlich alle SHA- sowie SHD-Klonsequenzen in Partialsequenzen zerlegt und die daraus erzeugten phylogenetischen Stammbäume miteinander verglichen. Jedoch wiesen alle Dendogramme eine übereinstimmende Baumtopologie auf, so daß die durch Anwendung von CHECK-CHIMERA erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden konnten.

Auch eine bevorzugte PCR-Amplifizierung einzelner rDNA-Moleküle kann zu einer Verzerrung von Diversitätsanalysen führen. Als Ursachen werden die Genomgröße und Anzahl der rRNA-Genkopien (Farrelly et al., 1995), die Wahl der Amplifikationsprimer (Rainey et al., 1994; Suzuki und Giovannoni, 1996; Hansen et al., 1998), der GC-Gehalt der rDNA (Reysenbach et al., 1992) sowie die Konzentration der Ausgangs-DNA (Chandler et al., 1997) diskutiert. Auch eine bevorzugte Klonierung bestimmter rDNA-Moleküle wurde beschrieben (Rainey et al., 1994). Allerdings wurde dieses Phänomen im Rahmen einer anderen rDNA-Diversitätsstudie nicht beobachtet (von Wintzingerode et al., 1999).

4.1.3 Bakterielle Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation

Zur Untersuchung der bakteriellen Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation wurde die 16S rDNA-Zusammensetzung (Klonbibliothek A) von Reaktorprobe S2 ermittelt, die etwa zwei Monate nach Beginn des Bioreaktorbetriebs entnommen worden war. Zu diesem Zeitpunkt lag eine stabil dechlorierende Population im Bioreaktor vor. Wie bei vielen vergleichbaren Diversitätsstudien anderer Habitats wies die DCP-dechlorierende Population eine außerordentlich komplexe bakterielle 16S rDNA-Zusammensetzung auf. Die Interpretation dieser Sequenzdaten, d.h. die Zuordnung der rDNA-Sequenzen zu bakteriellen Spezies bzw. zu bakteriellen Gruppen, wurde dadurch erschwert, daß der gewonnene rDNA-Datensatz nahezu keine identischen, jedoch eine Vielzahl sehr ähnlicher Sequenzen beinhaltete. Solche 16S rDNA-Sequenzen werden in der phylogenetischen Analyse nicht eindeutig aufgelöst und führen in Dendogrammen zu charakteristischen „Sequenzbüschen“. Für dieses in molekularen Diversitätsanalysen häufig auftretende Phänomen (z.B. Borneman et al., 1996; Choi et al., 1994; Field et al., 1997; Stackebrandt et al., 1993; von Wintzingerode et al., 2000) sind rDNA-

Mikroheterogenitäten verantwortlich, die in den meisten Fällen individuelle, aber sehr nah verwandte Spezies repräsentieren. rDNA-Mikroheterogenitäten können allerdings auch durch das Vorkommen multipler 16S rDNA-Operons innerhalb einer Spezies (Mylvaganam und Dennis, 1992; Nübel et al., 1996; Rainey et al., 1996) oder aber durch PCR-Fehler verursacht werden (Speksnijder et al., 2001). Solche Effekte täuschen unter Umständen eine erhöhte mikrobielle Diversität vor.

Weitere Inkonsistenzen in der Interpretation von 16S rDNA-Sequenzdaten aus komplexen Populationen werden durch das inadequate prokaryotische Spezieskonzept verursacht (Ferris et al., 1996). Die Klassifizierung von Bakterien erfolgt gegenwärtig nach unterschiedlichen taxonomischen, phylogenetischen und biologischen Konzepten und ist, obwohl häufig als „polyphasisches Konzept“ angewandt, in vielen Fällen uneindeutig (Rosselló-Mora und Amann, 2001; Schlöter et al., 2000). Für Fragestellungen innerhalb der mikrobiellen bzw. molekularen Ökologie wird darüber hinaus ein ökologisches Spezieskonzept vorgeschlagen, daß die Evolution von Mikroorganismen im wesentlichen als Folge der ökologischen Rahmenbedingungen begreift und in diesem Sinne einen sogenannten „Ökotyp“ als Gruppe mikrobieller Spezies mit gemeinsamer Ökologie fordert (Ferris et al., 1996). Unterschiedliche Ökotypen können über nahezu identische ribosomale RNA verfügen. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, sehr nah verwandte rDNA-Sequenzen in Gruppen (oder Klonfamilien) zusammenzufassen, die auf einer Sequenzähnlichkeit von mehr als 97% beruhen (Speksnijder et al., 2001). Diese Vorgehensweise ermöglicht eine einheitlichere Analyse des rDNA-Datensatzes und erleichtert zudem den Vergleich mit den Ergebnissen anderer klonaler Studien.

Der Vergleich der bei der Analyse von Klonbibliothek A gefundenen 16S rDNA-Sequenzen mit den in Datenbanken befindlichen Einträgen zeigte, daß die Zusammensetzung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation außerordentlich divers war. Wie bei zahlreichen molekularen Diversitätsuntersuchungen anderer Habitats, wurden in der DCP-dechlorierenden Reaktorpopulation überwiegend Sequenzen bislang nicht-kultivierter Spezies gefunden. Dieser Befund bestätigte die Wahl kulturunabhängiger Methoden zur Charakterisierung der DCP-dechlorierenden Mischkultur.

Die nachfolgende phylogenetische Analyse des rDNA-Datensatzes ermöglichte die Einordnung der Klonfamilien innerhalb der *Bacteria*. Dazu wurden die SHA-Klonsequenzen durch Anwendung unterschiedlicher Berechnungsalgorithmen mit den in 16S rDNA-Datenbanken hinterlegten Sequenzen sowie untereinander verglichen. Die Ergebnisse der phylogenetischen Berechnungen wurden in Form von Bäumen, entweder als Dendogramme oder Radialbäume, dargestellt. Im Gegensatz zur reinen binären Ähnlichkeitsmatrix, die etwa im Rahmen eines primären Datenbankabgleichs erstellt wird, basieren die phylogenetischen Berechnungsalgorithmen auf Modellen, die evolutionäre Veränderungen eines molekularen Markers simulieren. Das resultierende

Verzweigungsmuster eines Baumes, die Baumtopologie, repräsentiert die evolutionäre Entwicklung einer Sequenz, während die Summe der Astlängen ein Maß für die jeweilige phylogenetische Distanz darstellt. Üblicherweise kommen drei Berechnungsmethoden zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume zur Anwendung, die sogenannten „Distance Matrix“- , „Maximum Parsimony“- sowie „Maximum Likelihood“-Analysen. Jede dieser Methoden basiert auf unterschiedlichen evolutionären Modellen mit charakteristischen Annahmen bzw. Vereinfachungen und verfügt über spezifische Vor- und Nachteile (z. Übersicht siehe Ludwig et al., 1998). Da das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren abhängt (Art des molekularen Markers, Berechnungsmethoden, Qualität des Sequenzalignments, Länge der Sequenzen, Sequenzierungsqualität, Anzahl der Datenbankeinträge etc.), existiert keine absolute Baumtopologie. Als Konsequenz sollten die Ergebnisse durch Verwendung mehrerer unterschiedlicher Ansätze reproduziert werden (Ludwig et al., 1997). Um diesen Anforderungen Genüge zu leisten, wurden die phylogenetischen Analysen der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation mittels zweier Berechnungsmethoden durchgeführt. In allen Fällen konnten die Ergebnisse, die unter Anwendung der „Neighbor-Joining-Methode“ (ein „Distance Matrix“-Verfahren) erhalten worden waren, durch die „Phylip-Parsimony-Analyse“ bestätigt werden. Auf die Durchführung einer „Maximum-Likelihood-Analyse“ zur zusätzlichen Überprüfung der erhaltenen phylogenetischen Verzweigungsmuster wurde verzichtet, da der Rechenaufwand die Kapazität üblicher Mikrocomputersysteme überstiegen hätte.

Einer der wichtigsten Einflußfaktoren auf die Qualität einer phylogenetische Analyse ist die Länge der verwendeten Sequenzen. Da zum einen der Informationsgehalt eines Markermoleküls natürlicherweise begrenzt ist und zum anderen unterschiedliche Teile der Primärstruktur Informationen über unterschiedliche phylogenetische Ebenen beinhalten, sollten grundsätzlich nur Vollsequenzen bei der Erstellung phylogenetischer Stammbäume Verwendung finden (Ludwig und Schleifer, 1994). Dies gilt vor allem für molekulare Diversitätsanalysen bislang unbekannter Habitate, in denen ein Großteil der gefundenen Sequenzen nur geringe Ähnlichkeiten zu den vorhandenen Datenbankeinträgen aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grunde nahezu alle 16S rDNA-Inserts der SHA-Klone vollständig sequenziert. Diejenigen SHA-Klone, deren 16S rDNA-Inserts als Partialsequenzen vorlagen, umfaßten mindestens 1000 Basenpaare. Trotzdem mußten z.T. sehr kurze Partialsequenzen (z.B. Klon DGGE band 8) aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeiten zu den SHA-Klonen bei der phylogenetischen Analyse berücksichtigt werden. Neben der limitierten phylogenetischen Aussagekraft kurzer Partialsequenzen führen diese bei gleichzeitiger Analyse mit deutlich längeren Sequenzen zu instabilen Stammbaumtopologien (Ludwig et al., 1998). Grundsätzlich kann dieses Problem durch Angleich der Sequenzlängen umgangen werden. Jedoch wurden die SHA-Klonsequenzen nicht verkürzt, da dies einen nicht zu rechtfertigenden

Verlust phylogenetisch relevanter Sequenzinformation bedeutet hätte.

Die oben diskutierten Aspekte einer sorgfältigen Sequenzanalyse spielen dann eine wesentliche Rolle, wenn neue bakterielle Phylum-Cluster ausschließlich anhand von Sequenzdaten identifiziert werden. Ein aus reinen 16S rRNA-Daten abgeleitetes bakterielles Phylum-Cluster wird als eine Gruppe aus mindestens zwei Sequenzen angesehen, die in der phylogenetischen Analyse reproduzierbar monophyletisch erscheint und eine deutliche Distanz zu allen anderen bakteriellen Phyla bzw. Phylum-Clustern aufweist (Hugenholtz et al., 1998b). Die typische phylogenetische Distanz zwischen Bakterien unterschiedlicher Phyla beträgt dabei 20 – 25%. Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Diversitätsanalyse wurden zwei neue bakterielle Untergruppen der Grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (Gruppe SHA-16) sowie des *Holophaga-Acidobakterium-Fibrobacter*-Phylums (Gruppe SHA-71) gefunden. Darüber hinaus wurden drei neue Phylum-Cluster definiert, Saale-1 bis Saale-3. Mit Ausnahme von Gruppe SHA-17, die sich ausschließlich aus SHA-Klonen zusammensetzt, beinhalten Gruppe SHA-16 bzw. Phylum-Cluster Saale-1 bis Saale-3 auch aus anderen Habitaten stammende Klonsequenzen. Dieser Befund bestätigte sowohl die betreffenden SHA-Klonsequenzen als auch diejenigen der anderen Biotope in ihrer Funktion als Ökotypen repräsentierende Markermoleküle, da bei Einzelsequenzen ohne phylogenetisch näher verwandten rDNA-Datenbankeintrag (>92%) das Vorliegen eines PCR-Artefakts nicht mit Gewißheit ausgeschlossen werden kann (z.B. Klon SHA-59). Die hier neu eingeführten bakteriellen Gruppen sowie Phylum-Cluster erweitern damit die verfügbaren Daten zur mikrobiellen Diversität sowie die Informationen zur Verteilung der betreffenden Mikroorganismen in der Umwelt.

Der Vergleich der SHA-Klonsequenzen mit den Einträgen der 16S rRNA-Datenbanken wies in vielen Fällen hohe Ähnlichkeitswerte zu rDNA-Sequenztypen auf, die im Rahmen zweier anderer molekularer Diversitätsstudien gefunden worden waren. In der ersten dieser beiden vergleichenden 16S rRNA-Analysen wurde ein Aquifer eines Militärflughafengeländes (Wurtsmith Airforce Base) untersucht, in den eine Vielzahl unterschiedlichster Kohlenwasserstoffe sowie chlorierter Lösemittel, u.a. Chlor- und Dichlorethan, über einen Zeitraum von ca. 30 Jahren in großen Mengen eingebracht wurden (Dojka et al., 1998). Innerhalb des Aquifers herrschten anaerobe Bedingungen mit nitrat-, eisen-/sulfat-, bzw. sulfatreduzierenden Bereichen sowie einer methanogenen Zone, die beprobt und anschließend einer vergleichenden 16S rRNA-Analyse unterzogen wurden (WCHA-, WCHB-, WCHD-, WsCH- und WFeA- oder "Wurtsmith-Klone"). Der überwiegende Teil der Wurtsmith-Klone (etwa 70%) ließ sich bekannten bakteriellen Phyla zuordnen, darunter hauptsächlich die GNS, die Grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt sowie die Proteobakterien. Etwa 20% der Wurtsmith-Klone waren mit vier Phylum-Clustern assoziiert, die ursprünglich anhand von 16S rDNA-Sequenzen aus einer heißen Quelle (Yellowstone Nationalpark, USA) identifiziert worden waren

(Hugenholtz et al., 1998a). Die restlichen 10% der Wurtsmith-Sequenzen wurden in sechs neu eingeführte Phylum-Cluster eingeordnet (WS1 – WS6; Dojka et al., 1998; Dojka et al., 2000).

In der zweiten 16S rRNA-Studie wurde die mikrobielle Diversität eines anaeroben Trichlorbenzol (TCB)-dechlorierenden Bioreaktorkonsortiums untersucht (von Wintzingerode et al., 1999). Wie im Falle der DCP-dechlorierenden Population wurde die TCB-dechlorierende Mischkultur aus Saalesediment angereichert, jedoch lag die Probenentnahmestelle etwa 200 km flußaufwärts von Halle in der Nähe von Jena. Eine große Zahl der bei der Diversitätsanalyse der TCB-transformierenden Mischkultur gefundenen Klonsequenzen (SJA-Sequenzen für „Saale, Jena, Klonbibliothek A“ oder "Trichlorbenzol-Klone") gehörten zu den GNS, den Proteobakterien, dem Phylum-Cluster OP10 (Hugenholtz et al., 1998a) sowie den Spirochäten und wiesen hohe Ähnlichkeiten zu den auf dem kontaminierten Militärflughafengelände gefundenen Wurtsmith-Klonsequenzen auf.

Wie im DCP-dechlorierenden Bioreaktor wurden sowohl in dem mit CKW kontaminierten Flughafengelände als auch in dem TCB-transformierenden Bioreaktor chlorierte organische Verbindungen unter anaeroben Bedingungen umgesetzt. Folglich kann von einer reduktiven mikrobiellen Dechlorierung der umgesetzten chlorierten Verbindungen ausgegangen werden (Löffler et al., 1999). Die auffälligen Ähnlichkeiten zwischen den Klonsequenzen beider reduktiv dechlorierenden Habitate, dem Wurtsmith-Standort und der TCB-dechlorierenden Mischkultur, konnten anhand der Diversitätsanalyse der DCP-dechlorierenden Population erweitert werden. Etwa 32% aller gefundenen SHA-Klone zeigten mehr als 92% Sequenzähnlichkeit zu Wurtsmith bzw. Trichlorbenzol-Klonsequenzen. Es konnten sechs bakterielle Sequenzcluster, SHA-I bis SHA-VI, definiert werden, die fast ausschließlich in reduktiv dechlorierenden Lebensräumen gefundene 16S rDNA-Sequenzen umfaßten. Zwei der SHA-Cluster (SHA-II und SHA-III) beinhalteten Sequenzen, die zu den GNS gehörten. Obwohl das GNS-Phylum vor etwa 15 Jahren erstmalig eingeführt wurde (Woese, 1987), existieren bis zum heutigen Zeitpunkt kaum entsprechende Isolate. Das Wissen über diese bakterielle Gruppe ist daher vergleichsweise gering. GNS-Bakterien treten in allen drei reduktiv dechlorierenden Habitaten in relativ großer Zahl und Variation auf. Das gleiche gilt für die u.a. durch Cluster SHA-IV und SHA-V repräsentierten Grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, die im Gegensatz zu den GNS-Bakterien ein Phylum mit einer Vielzahl kultivierter Vertreter darstellen. So wurden in der DCP- sowie in der TCB-dechlorierenden Mischkultur die Klonfamilien SHA-67 bzw. SJA-19 gefunden, die über 97% Sequenzähnlichkeit zu *Dehalobacter restrictus* PER-K23 (Holliger et al., 1998) bzw. *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA (Wild et al., 1996) aufwiesen. Beide Spezies sind in der Lage, Tri- und Tetrachlorethen reduktiv zu dechlorieren.

Neben den Untersuchungen der oben genannten Habitate, bei denen es sich um Süßwasserhabitate handelt, wurden noch zwei weitere 16S rRNA-Diversitätsanalysen von marinen Lebensräumen durchgeführt, in denen chlororganische Verbindungen reduktiv umgesetzt wurden. So führte die vergleichende 16S rRNA-Analyse einer anaeroben Sedimentanreicherungskultur, die polychlorierte Biphenyle (PCB) umsetzte, zu insgesamt 16 dominanten Sequenztypen (RFLP-Klone; Pulliam-Holoman et al., 1998). Das Sediment wurde ursprünglich einem Hafenbecken in Baltimore (USA) entnommen. Mit Ausnahme eines Klons zeigte keiner der dominanten RFLP-Klone signifikante phylogenetische Verwandtschaft zu WurtSmith-, Trichlorbenzol- oder SHA-Klonsequenzen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Diversitätsanalyse einer Tetrachlorethen-transformierenden mikrobiellen Mischkultur, die aus Sediment eines Rotterdamer Hafenbeckens (Niederlande) angereichert worden war (Kengen et al., 1999). Hier wurden zwei dominante Sequenztypen (ST-Klone) identifiziert, die beide zu den Grampositiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt gehörten und Sequenzähnlichkeiten von je 90% zu *Dehalobacter restrictus* (Klon ST10) bzw. 86% zum Genus *Desulfotomaculum* (Klon ST12) aufwiesen. Diese Sequenzähnlichkeiten sind allerdings in einer Größenordnung, die keine nähere Verwandtschaft der ST-Klone zu den genannten Gattungen repräsentiert. Wie die RFLP-Klone sind auch die ST-Klone phylogenetisch von den WurtSmith-, Trichlorbenzol- und SHA-Klonen deutlich entfernt. Daraus folgt, daß die mikrobielle Zusammensetzung reduktiv dechlorierender Salzwasserhabitate offenbar von derjenigen reduktiv dechlorierender Süßwasserhabitate deutlich abweicht. Die durch den Vergleich dreier Diversitätsanalysen gefundenen Sequenzübereinstimmungen innerhalb reduktiv dechlorierender Süßwasserhabitate lassen hingegen eine spezifische Populationsstruktur in diesen Lebensräumen vermuten, in denen von grundsätzlich vergleichbaren physiologischen Rahmenbedingungen ausgegangen werden kann. Da ferner die WurtSmith-Sequenzen im Gegensatz zu den Trichlorbenzol- bzw. SHA-Sequenzen auf dem nordamerikanischen Kontinent gefunden wurden, scheint eine spezifische mikrobielle Zusammensetzung vorzuliegen, die sich auch in deutlich voneinander getrennten geografischen Räumen herausgebildet hat.

Wie bereits im Abschnitt 4.1.2 diskutiert, unterliegen PCR-basierte 16S rRNA-Analysen einer Reihe von Fehlermöglichkeiten. Die Vergleichbarkeit von 16S rDNA-Klonbibliotheken, die unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen sowie aus Probenmaterial unterschiedlicher Habitate angelegt wurden, ist folglich eingeschränkt (Head et al., 1998). Daher wurden die experimentellen Bedingungen der hier verglichenen 16S rRNA-Diversitätsstudien, d.h. die beprobten Habitate, kontaminierenden Verbindungen, Zellaufschlußmethoden, Klonierungssysteme und PCR-Primer, zur genaueren Analyse in Tab. 4.1 miteinander verglichen.

Tab. 4.1 Experimentelle Bedingungen der miteinander verglichenen 16S rDNA-Klonbibliotheken.

Habitat	Chlorierte Verbindung	Zellysis	Klonierungsverfahren	Bakterielle PCR-Primer	Referenz
Flußsediment, Bioreaktor	Dichlorpropan	enzymatisch, frieren/tauen, Detergenz	TA-Klonierung	27f – 1522r	diese Arbeit
Flußsediment, Bioreaktor	Trichlorbenzol	enzymatisch, frieren/tauen, Detergenz	TA-Klonierung, LIC-Klonierung	27f – 1522r	von Wintzingerode et al. (1999)
Aquifer, Boden	Kohlenwasserstoffe/chlorierte Verbindungen	Bead-Beater, enzymatisch, Detergenz	TA-Klonierung	27f – 1492r, 533f – 1492r,	Dojka et al. (1998)
marines Sediment	Tetrachlorbiphenyl	Bead-Beater, Detergenz	TA-Klonierung	519f – 1406r	Pulliam Holoman et al. (1998)
marines Sediment	Tetrachlorethen	Guanidinthiocyanat, Bead-Beater	TA-Klonierung	8f – 1512r	Kengen et al. (1999)

Bei den 16S rDNA-Diversitätsanalysen der drei reduktiv dechlorierenden Süßwasserhabitats fanden unterschiedliche Probenmaterialien sowie voneinander abweichende Zellysis- bzw. PCR-Protokolle Verwendung. Trotzdem konnten in diesen Lebensräumen deutliche Übereinstimmungen der bakteriellen Zusammensetzung gefunden werden. Im Gegensatz dazu führten gleiche Zellysismethoden und PCR-Bedingungen in den Diversitätsanalysen des marinen PCB-dechlorierenden Habitats (Pulliam Holoman et al., 1998) und des kontaminierten Aquifers (Dojka et al., 1998) zu keinen nennenswerten Ähnlichkeiten zwischen den gefundenen 16S rDNA-Sequenzen. Es kann folglich davon ausgegangen werden, daß die experimentellen Bedingungen der hier miteinander verglichenen molekularen Diversitätsanalysen keine wesentlichen Auswirkungen auf die Ergebnisse hatten.

4.1.4 Archaeale Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation

Zur Untersuchung der archaealen Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation wurde die 16S rDNA-Zusammensetzung von Reaktorprobe S2 ermittelt (Klonbibliotheken B und C). Im Gegensatz zur bakteriellen Zusammensetzung, die ebenfalls ausgehend von Probe S2 untersucht wurde (siehe 4.1.3), war die Diversität der Archaea in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation gering. Anhand der 16S rDNA wurden im wesentlichen zwei dominierende methanogene Spezies nachgewiesen, *Methanosaeta concilii* sowie *Methanomethylovorans hollandica*. *Methanosaeta concilii*-

ähnliche Spezies wurden bereits häufig in molekularen Diversitätsanalysen unterschiedlicher anaerober Habitate gefunden, darunter auch eine Vielzahl von Bioreaktorpopulationen (Leclerc et al., 2001; Schmidt und Ahring, 1999). Archaea dieser Spezies dominierten auch die mikrobiellen Populationen der bereits unter 4.1.3 erwähnten reduktiv dechlorierenden Süßwasserhabitate (Dojka et al., 1998; von Wintzingerode et al., 1999). Bei *Methanomethylovorans hollandica* hingegen handelt es sich um eine erst vor kurzem aus Süßwassersediment (Nijmegen, Niederlande) erstmalig isolierte methanogene Spezies, die in der Lage ist, Dimethylsulfid als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Lomans et al., 1999). Von der Gattung *Methanomethylovorans* wurde kürzlich noch eine zweite Spezies, *Methanomethylovorans victoriae* Stamm TM (AJ276437) isoliert, die aus dem Viktoriasee in Tansania stammt.

Neben den zwei dominierenden *Methanosaeta*- und *Methanomethylovorans*-ähnlichen 16S rDNA-Sequenztypen wurden u.a. zwei Klonsequenzen gefunden, die hohe Ähnlichkeiten zu Klon WCHD3-07 aufwiesen. Dieser Klon wurde bislang ausschließlich in dem mit chlorierten Lösemitteln kontaminierten Wurtsmith-Flughafengelände nachgewiesen (Dojka et al., 1998). Die Dominanz von *Methanosaeta concilii* sowie die hohen Ähnlichkeiten von SHB- bzw. SHC-Klonen zu bislang ausschließlich am Wurtsmith-Standort gefundenen Klonsequenzen unterstreichen die bereits anhand der bakteriellen Diversität ermittelte spezifische Populationsstruktur reduktiv dechlorierender Süßwasserhabitate.

4.2 Veränderung der DCP-dechlorierenden Population im Bioreaktor

Durch die Analyse der Klonbibliotheken A, B und C wurde die Diversität der Bakterien sowie der Archaea in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorkultur erfaßt. Es ergaben sich wesentliche Übereinstimmungen zu anderen reduktiv dechlorierenden Süßwasserhabitaten, so daß von einer spezifischen Populationsstruktur dieser Lebensräume ausgegangen werden kann. Darüber hinaus wurden neue bakterielle Sequenzcluster bzw. Einzelsequenzen identifiziert. Der zum Cluster SHA-IV gehörende Klon SHA-67 wies über 97% Sequenzähnlichkeit zum dehalorespirierenden Bakterium *Dehalobacter restrictus* auf.

Alle bisherigen Untersuchungen basierten auf der Probe S2 und stellten folglich eine Momentaufnahme der mikrobiellen Populationszusammensetzung unmittelbar nach Ende der Anfahrphase des Bioreaktors dar. Im Anschluß daran wurde das Verfahren durch Variation der Verweilzeit, der Substratzusammensetzung sowie der DCP-Konzentration optimiert (Hauck, 2000). In diesem etwa 14 Monate umfassenden Zeitraum wurde das zugeführte DCP durch die Bioreaktorpopulation mit Transformationsraten zwischen 60%

und 98% kontinuierlich dechloriert. Es stellte sich die Frage, ob sich die DCP-transformierende Population im Zuge der längeren Reaktorbetriebsdauer veränderte. Daher wurde Probe S2 zusammen mit weiteren fünf zu anderen Zeitpunkten entnommenen Reaktorproben (S1, S3 – S6, siehe Tab. 3.1) durch eine Kombination unterschiedlicher molekularer Methoden untersucht (DGGE, 16S rDNA-Klonbibliothek, QE-PCR und FISH). Die Auswahl der Methoden diene sowohl der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als auch dem Ausgleich spezifischer Nachteile eines einzelnen Ansatzes (Muyzer, 1999).

4.2.1 Untersuchung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation mittels DGGE

Die DGGE wurde 1993 von Muyzer und Mitarbeitern (Muyzer et al., 1993) erstmals bei Fragestellungen der mikrobiellen Ökologie angewandt. Als molekulare Fingerprinting-Methode wird sie häufig zur orientierenden Analyse von Diversität und Dynamik mikrobieller Lebensräume eingesetzt (zur Übersicht s. Muyzer und Smalla, 1998; Muyzer, 1999). In der DGGE beruht die spezifische Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten auf der Eigenschaft doppelsträngiger DNA-Moleküle, in Abhängigkeit ihrer Basenzusammensetzung unterschiedliche Schmelzverhalten zu zeigen. Das allmähliche Aufschmelzen einer DNA führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls, die ein verändertes elektrophoretisches Laufverhalten in einer Gelmatrix zur Folge hat. Partiiell denaturierte DNA bewegt sich im Elektrophoresegel langsamer als nicht-denaturierte DNA. Da ein DGGE-Gel mit einem Gradienten eines oder mehrerer denaturierender Agenzien versehen ist, kommt es folglich zu einer Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Basenzusammensetzung in Abhängigkeit ihres jeweiligen Schmelzverhaltens. Die durch die PCR-Amplifikation eingebrachte "GC-Klammer" eines zu trennenden DNA-Fragments verhindert dabei die vollständige Denaturierung des Moleküls. Auf diese Weise entstehen Proben-spezifische Bandenprofile, die miteinander verglichen werden können. In der mikrobiellen Ökologie erlaubt dieser methodische Ansatz eine vergleichsweise schnelle Erfassung der 16S rDNA-Zusammensetzung einer komplexen mikrobiellen Population.

Insgesamt vier Proben der DCP-dechlorierenden Reaktorkultur (S1 – S4) wurden mit Hilfe der DGGE untersucht. Die erhaltenen Bandenmuster zeigten, daß sich die Bioreaktorkultur innerhalb eines Zeitraums von etwa 10 Monaten (S1 – S3) signifikant verändert hatte. Vor allem während der Reaktoranfahrphase (S1 – S2) fand ein deutlicher Wandel der bakteriellen Zusammensetzung statt, während nach Ablauf von etwa 10 Monaten (S3 – S4) eine vergleichsweise stabile Phase zu verzeichnen war. Das erhaltene Gesamtprofil verdeutlicht den kontinuierlichen Adaptionsprozeß der bakteriellen Population im Reaktor, der in einem stabilen DCP-umsetzenden Konsortium mündet.

In allen vier Proben waren jeweils etwa 30 16S rDNA-Banden zu unterscheiden. Im Idealfall entspricht eine rDNA-Bande einem mikrobiellen Ökotyp. Da die Analyse der DCP-

dechlorierenden Population durch vergleichende 16S rDNA-Analyse zu mindestens 75 durch einzelne Klonfamilien repräsentierte Ökotypen geführt hatte (Probe S2), ist davon auszugehen, daß die bakterielle Diversität innerhalb der vier untersuchten Reaktorproben (S1 – S4) durch die DGGE-Profile unterschätzt wurde. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen beider methodischen Ansätze verdeutlicht spezifische Limitierungen der DGGE-Analyse. So ist das Auflösungsvermögen von rDNA-Fragmenten sehr komplex zusammengesetzter mikrobieller Lebensgemeinschaften in der DGGE begrenzt (Muyzer und Smalla, 1998). Im Rahmen einer Studie zur Diversität von bakteriellem Plankton in Flußmündungen kommen die Autoren zu dem Schluß, daß lediglich abundante Ökotypen, die mehr als 1% der Gesamtpopulation ausmachen, durch die DGGE erfaßt werden (Murray et al., 1996). Da der überwiegende Teil der SHA-Sequenzen nur ein- oder zweimal innerhalb der Klonbibliothek A gefunden worden war, ist davon auszugehen, daß viele dieser Sequenzen nicht von der DGGE erfaßt wurden. Darüber hinaus zeigten eine Vielzahl der SHA-Klonsequenzen (vor allem GNS-Sequenzen) untereinander nur relativ geringe Sequenzunterschiede, so daß die betreffenden rDNA-Fragmente möglicherweise nicht von der DGGE aufgelöst werden konnten. Die in der Literatur publizierten Ergebnisse zum Auflösungsvermögen einzelner rDNA-Fragmente durch die DGGE sind widersprüchlich. So zeigten Arbeiten zur 16S rRNA-Mikroheterogenität von *Paenibacillus polymyxa*, daß rDNA-Fragmente, die sich in ihrer Sequenz um nur ein Basenpaar unterschieden, durch die DGGE aufgetrennt werden konnten (Nübel et al., 1996). Auf der anderen Seite wird von 16S rDNA-Fragmenten unterschiedlicher methanoxidierender Bakterien berichtet, die trotz signifikanter Sequenzunterschiede nicht durch die DGGE getrennt wurden (Vallaey et al., 1997). Offenbar spielen Primär- und Sekundärstruktur der amplifizierten rDNA-Fragmente sowie die experimentellen DGGE-Bedingungen eine wichtige Rolle. Neben einem begrenzten Auflösungsvermögen der DGGE kann auch die Ko-Migration von rDNA-Fragmenten das qualitative Ergebnis einer DGGE verfälschen. Dieses Phänomen führt zu heterogen zusammengesetzten rDNA-Banden, so daß die tatsächliche mikrobielle Diversität somit unterschätzt wird.

Ein wesentlicher Vorteil der DGGE besteht in der Möglichkeit zur semi-quantitativen Analyse der erhaltenen Bandenprofile bzw. Einzelbanden (Nübel et al., 1996). Anhand der kalkulierten rA-Werte (relative Abundanz) kann die Präsenz bakterieller Ökotypen in den untersuchten Proben verfolgt werden. Da jedoch eine DGGE-Bande in Folge von Ko-Migration oder Operon-Mikroheterogenitäten ungleichmäßig zusammengesetzt sein kann (Muyzer und Smalla, 1998), sollte eine nachfolgende Klonierung und Sequenzierung der korrespondierenden rDNA-Fragmente erfolgen, um die betreffende Bande eindeutig zu identifizieren. Die DGGE-Analyse der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation ergab infolge der hohen bakteriellen Diversität ein komplexes Bandenprofil. Das kontaminationsfreie Ausschneiden einzelner Banden war technisch schwierig. In zwei Fällen konnten jedoch dominante Banden, die innerhalb des DGGE-Profiles eine

hinreichend exponierte Position aufwiesen, aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert werden (Banden A-S4 und B-S4). Bande A-S4 wies eine sehr heterogene Zusammensetzung auf. Nur drei Klonsequenzen waren identisch und zeigten hohe Sequenzähnlichkeiten zu *Dehalococcoides ethenogenes* (Maymó-Gatell, 1997) und Isolat CBDB1 (Adrian et al., 2000). Beide bakteriellen Spezies sind in der Lage chlororganische Verbindungen durch Halorespiration vollständig reduktiv zu dechlorieren. *Dehalococcoides*-ähnliche Bakterien wurden kürzlich an mehreren mit Chlororganika belasteten Standorten in den USA und in den Niederlanden gefunden (Löffler et al., 2000). Das Auftreten von *Dehalococcoides*-ähnlichen Spezies in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation und demzufolge auch im Sediment der Saale ist ein weiteres Indiz für die offenbar weite Verbreitung dieses Bakteriums in unterschiedlichen geografischen Regionen. Ein weiterer interessanter Befund der Analyse von Bande A-S4 war die Identifikation des rDNA-Fragments von Klon SHE-137. Die betreffende Sequenz gehört zum Phylum-Cluster Saale-3 und unterstützt damit die Existenz dieser neu identifizierten bakteriellen Hauptgruppe.

Im Gegensatz zu Bande A-S4 war Bande B-S4 nahezu homogen aus *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen 16S rDNA-Fragmenten zusammengesetzt und wurde in drei Reaktorproben (S2 - S4) nachgewiesen. Daher konnten in diesem Fall Rückschlüsse bzgl. der Abundanz dieses halorespirierenden Bakteriums in der DCP-transformierenden Population gezogen werden. Anhand der ermittelten rA-Werte von Probe S2 und Probe S3 läßt sich eine signifikante Anreicherung *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher Bakterien im Reaktor ableiten. Dieser Befund wird durch den mitgeführten Marker (amplifizierte *Dehalobacter restrictus*-rDNA), der eine identische Gelmigration aufweist, bestätigt. Auch unter Berücksichtigung der experimentellen Störfaktoren jeder PCR-vermittelten Diversitätsanalyse (z.B. Probenaufarbeitung, PCR-Artefakte, rRNA-Operonmikroheterogenitäten; siehe 4.1.2) erscheint die quantitative Interpretation der DGGE-Banden B-S2 bis B-S4 aufgrund der überaus deutlichen Dominanz der *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen 16S rDNA-Fragmente plausibel.

4.2.2 Untersuchung der mikrobiellen Diversität der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation anhand von Klonbibliothek D

Ausgehend von der Reaktorprobe S3 wurde eine weitere 16S rDNA-Klonbibliothek angelegt und durchgemustert (Klonbibliothek D, SHD-Klone). Basierend auf den Ergebnissen der Klonbibliothek A sowie der DGGE-Analyse wurde der Fokus beim Durchmustern von Klonbibliothek D auf die sechs SHA-Sequenzcluster (SHA-I bis SHA-VI) gelegt. Zusätzlich wurden im Zuge der Hybridisierungsexperimente *Dehalobacter restrictus*- bzw. *Dehalococcoides ethenogenes*-ähnliche 16S rDNA-Sequenzen explizit in Klonbibliothek D gesucht. Die von der DGGE-Analyse abgeleitete Anreicherung *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher Bakterien bis hin zur dominierenden Spezies innerhalb

der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation konnte anhand der SHD-Klonzusammensetzung bestätigt werden. Während in Klonbibliothek A lediglich ein einzelner *Dehalobacter*-ähnlicher Klon gefunden worden war (Klon SHA-67), umfaßte Klonbibliothek D etwa 100 Klone mit höchster Sequenzähnlichkeit zu *Dehalobacter restrictus* Stamm TEA (Wild et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnten keine *Dehalococcoides ethenogenes*-ähnlichen SHD-Klone nachgewiesen werden. Beide Stämme, *Dehalococcoides ethenogenes* sowie Isolat CBDB1, weisen in ihrem 16S rRNA-Gen die Primerbindungsstelle der verwendeten universellen Primer TPU1 und RTU8 auf und hätten demzufolge PCR-amplifiziert werden können. Der Versuch, *Dehalococcoides ethenogenes* durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern in den Reaktorproben nachzuweisen, schlug fehl (Daten nicht gezeigt). Demzufolge repräsentierten die *Dehalococcoides*-ähnlichen DGGE-Sequenzen möglicherweise Ökotypen, die Sequenzvariationen in den Bindungsbereichen der verwendeten spezifischen Primer aufweisen. Das Nicht-Vorhandensein *Dehalococcoides*-ähnlicher rDNA-Sequenzen in Klonbibliothek D kann allerdings auch durch ein geringes Vorkommen des betreffenden Ökotyps in der Reaktorpopulation begründet sein.

Neben *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen Spezies sind auch andere Bakterien in der Reaktormischkultur häufig vertreten. Wie schon in Klonbibliothek A waren auch in Klonbibliothek D GNS-Ökotypen in großer Variation und Zahl anzutreffen. Es wurden mehrere 16S rDNA-Sequenzen gefunden, die zu den spezifischen GNS-Clustern SHA-II und SHA-III gehörten. Mit Ausnahme von Cluster SHA-VI konnten auch im Falle der anderen SHA-Sequenzcluster verwandte Sequenzen innerhalb der Klonbibliothek D gefunden werden. Die durch diese Sequenzen repräsentierten Ökotypen wurden folglich auch über einen längeren Zeitraum nicht durch andere Organismen verdrängt oder vollständig ausgewaschen. Neben *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen Spezies besitzen demzufolge auch diese bislang nicht-kultivierten Mikroorganismen das Potential, als Marker- oder Indikatororganismen zur Überwachung und Optimierung des Bioreaktorprozesses zu fungieren.

4.2.3 Quantifizierung *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher 16S rDNA in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation

Um die Anreicherung *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher bakterieller Spezies in der Reaktormischkultur bestätigen zu können, wurde der Gehalt entsprechender 16S rDNA mittels quantitativer PCR bestimmt. Bislang wurden hauptsächlich drei quantitative PCR-Methoden angewandt, die Verdünnungs-PCR (Pillai et al., 1991; Sykes et al., 1992), die kinetische PCR (Alard et al., 1993; Higuchi et al., 1992) sowie die kompetitive PCR (Felske et al., 1998a; Yu et al., 1999). Alle drei Methoden haben den entscheidenden Nachteil, auf einer Endpunktmessung der amplifizierten Nukleinsäure zu beruhen. Dies kann zu einer deutlichen Verfälschung der ermittelten Nukleinsäure-

Ausgangskonzentration führen (Grüntzig et al., 2001). Ein solcher Fehler tritt bei der kürzlich eingeführten QE-PCR (Heid et al., 1996) nicht auf, da die Bildung des Amplifikationsprodukts während der Reaktion kontinuierlich gemessen wird. Die QE-PCR gilt als sensitive, reproduzierbare und effiziente Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (Lyons et al., 2000) und wurde in der mikrobiellen Ökologie bereits erfolgreich zur Quantifizierung von 16S rDNA in verschiedenen komplex zusammengesetzten Populationen angewandt, so z.B. in marinem Plankton (Becker et al., 2000; Suzuki et al., 2000) und in Bodenproben (Hermansson und Lindgren, 2001). In allen vorgenannten Studien wurde die sogenannte TaqMan-Technologie verwendet (Livak et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde bakterielle Gesamt- sowie *Dehalobacter restrictus*-ähnliche 16S rDNA mit dem sogenannten „LightCycler“ quantifiziert (Fa. Roche, Mannheim). Dieses Gerät wurde bereits zum quantitativen Nachweis ribosomaler DNA im Rahmen medizinisch-mikrobiologischer Untersuchungen eingesetzt, so z.B. zur Quantifizierung von *Chlamydia trachomatis* (Mathews et al., 1999), *Collinsella aerofaciens* (Kageyama et al., 2000) oder *Leptospira biflexa* (Woo et al., 1999). Die technische Konfiguration des LightCyclers erlaubt es, Fluoreszenzemissionen, die mit Zunahme der PCR-Produktkonzentration ansteigen, während des Ablaufs einer PCR-Reaktion zu messen. Dazu muß die PCR in einem geeigneten „Format“ ablaufen, d.h. dem Reaktionsansatz müssen Substanzen hinzugefügt werden, die sowohl quantitativ mit dem PCR-Produkt reagieren, als auch Fluoreszenzenergie emittieren. Zum Nachweis von 16S rDNA in den Bioreaktorproben wurde der Farbstoff „SYBR-Green I“ verwendet. SYBR-Green I lagert sich selektiv in doppelsträngige DNA ein und emittiert Fluoreszenzenergie bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm. Mit größer werdender PCR-Produktkonzentration steigen demzufolge die vom SYBR-Green I erzeugten Fluoreszenzemissionen, so daß die Kinetik der PCR-Reaktion ermittelt werden kann. Aus der Reaktionskinetik werden der sog. „Crossing Point“ (Beginn der exponentiellen PCR-Produktzunahme) sowie die Steigung im „linearen Bereich“ bestimmt und zur Berechnung der DNA-Ausgangskonzentration verwendet. Beim „linearen Bereich“ handelt es sich um die Anfangsphase der exponentiellen PCR-Produktzunahme, die in logarithmierter Darstellung einen linearen Verlauf aufweist (Reaktionskinetik 1. Ordnung).

Zur Amplifikation *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher 16S rDNA aus den Bioreaktorproben wurden die neu abgeleiteten Primer deb179f sowie deb1007r eingesetzt. Sie basierten auf einem Datensatz von über 20 *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen 16S rDNA-Sequenzen, die in der ARB-Datenbank hinterlegt waren. Simultan zur *Dehalobacter*-rDNA wurde bakterielle rDNA als Biomassemarker im LightCycler PCR-amplifiziert. Auf diese Weise war eine relative Quantifizierung *Dehalobacter*-ähnlicher Bakterien in bezug zur gesamten bakteriellen Population möglich. Dieser experimentelle Ansatz erlaubte den weitestgehenden Ausschluß von Meßwertverfälschungen, die durch variierende Proben-

bzw. Nukleinsäurepräparationen der vier untersuchten Bioreaktorproben hätten hervorgerufen werden können. Bestimmte Variablen wie etwa der GC-Gehalt oder die Zahl der rRNA-Operons sind jedoch nicht präzise erfaßbar.

Die gemessenen 16S rDNA-Konzentrationen in den Bioreaktorproben bestätigten die signifikante Anreicherung *Dehalobacter restrictus*-ähnlicher Bakterien im Bioreaktor. Die Anreicherung (8-fach) lag in der gleichen Größenordnung wie bei den DGGE-Daten (12-fach). Allerdings waren die ermittelten rDNA-Konzentrationen der gesamten Bakterien niedriger als die der *Dehalobacter*-ähnlichen. Diese Diskrepanz läßt sich durch unterschiedliche Amplifizierungseffizienzen der verwendeten Primerpaare erklären, da das vom Primerpaar TPU1/RTU8 amplifizierte rDNA-Fragment nahezu doppelt so lang ist (etwa 1550 bp), wie das vom Primerpaar deb179f/deb1007r. Darüber hinaus führt die im LightCycler verwendete Kapillartechnik bei längeren Amplikons zu einer stärkeren Abnahme der Produktausbeute. Aus diesem Grund wurden lediglich Konzentrationsänderungen miteinander verglichen, um die Anreicherung *Dehalobacter*-ähnlicher Bakterien im Bioreaktor erfassen zu können.

4.2.4 Untersuchung der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation durch FISH

Im Gegensatz zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit angewandten molekularen Methoden ist die FISH ein PCR-unabhängiges Verfahren zum Nachweis mikrobieller 16S rRNA in fixiertem mikrobiellen Probenmaterial. Demnach unterliegt die FISH nicht den spezifischen Fehlermöglichkeiten PCR-vermittelter Methoden (siehe 4.1.2) und ermöglicht eine direkte Quantifizierung von Mikroorganismen in komplexen Populationen unter Erhalt ihrer Zellintegrität (Moter und Göbel, 2000). In der mikrobiellen Ökologie wird die FISH bei Untersuchungen unterschiedlichster Habitate eingesetzt (zur Übersicht s. Amann und Ludwig, 2000). Beim Nachweis von Mikroorganismen der DCP-dechlorierenden Population durch FISH stellte allerdings die Art des Probenmaterials ein erhebliches technisches Problem dar. Ohne die vergleichsweise drastische Vorbehandlung des auf den PU-Körpern befindlichen mikrobiellen Biofilms, wie z.B. durch die Kombination aus Zerkleinern, Schütteln (Vortexing), Ultraschall und Natriumpyrophosphatzugabe, war eine FISH der Zellen nicht möglich. Eine ähnliche Probenvorbehandlung wurde beispielsweise zur Aufarbeitung von Mikroorganismen aus Bodenproben gewählt, in denen eine vergleichbare an Feststoffpartikeln gebundene Biomasse vorlag (Zarda et al., 1997).

Bei der mikroskopischen Quantifizierung von Mikroorganismen mittels FISH werden sowohl die positiv hybridisierten als auch die DAPI-markierten Zellen eines definierten Ausschnitts ausgezählt und ins Verhältnis zueinander gesetzt (Amann et al., 1995). Diese Vorgehensweise setzt zum einen eine repräsentative Probennahme und zum anderen eine direkte Weiterverarbeitung der Proben voraus. Die Mikroorganismen der DCP-

dechlorierenden Bioreaktorpopulation lagen zum überwiegenden Teil als an PU-Würfeln gebundene Biofilme und nicht in suspendierter Form vor, so daß eine repräsentative Beprobung des Reaktors nur eingeschränkt möglich war. Zudem konnte aufgrund des dichten Biofilms keine direkte FISH des Probenmaterials erfolgen. Es war darüber hinaus davon auszugehen, daß die zur Hybridisierung notwendige Vorbehandlung mit Natriumpyrophosphat und Ultraschall zu einer Schädigung einzelner Mikroorganismen und damit zu einer Verfälschung des mikroskopischen Auszählens führen würde. Folglich wurde auf eine quantitative Auswertung der FISH verzichtet. Vielmehr sollte die FISH als qualitative Plausibilitätskontrolle in Ergänzung zu den PCR-vermittelten Verfahren dienen.

Der Nachweis von Bakterien in der Bioreaktorpopulation mittels FISH führte zu keinem Erfolg. Dies widersprach den Ergebnissen aller anderen im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden. Mit Hilfe der DAPI-Färbung waren zwar eine Vielzahl unterschiedlicher Morphotypen mikroskopisch erkennbar, aber der überwiegende Teil dieser "Partikel" erschien vergleichsweise klein. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in FISH-Untersuchungen an Bakterioplankton unterschiedlicher Süßwasserproben beschrieben (Glöckner et al., 1999). Die Autoren vermuteten, es handle sich um virale Partikel, die in aquatischen Systemen eine beträchtliche Abundanz aufweisen (Heldal und Bratbak, 1991).

Für falsch-negative Hybridisierungsergebnisse der FISH kommen eine Reihe unterschiedlicher Ursachen in Betracht. So wird etwa durch eine geringe zelluläre 16S rRNA-Konzentration ein möglicherweise zu niedriges Fluoreszenzsignal erzeugt (Moter und Göbel, 2000). Geringe Ribosomenzahlen sind ein Hinweis auf geringe physiologische Aktivität der betreffenden Bakterien und können Ausdruck mikrobieller Überlebenstrategien zu Zeiten ungünstiger physiologischer Rahmenbedingungen sein (Kolter et al., 1993; Roszak et al., 1987). Da aber im Falle der Bakterien und insbesondere der *Dehalobacter restrictus*-ähnlichen Bakterien eine deutliche Anreicherung in der DCP-dechlorierenden Population nachgewiesen werden konnte (siehe 3.4), war von der physiologischen Aktivität vieler Zellen auszugehen. Weitere Ursachen für falsch-negative Hybridisierungsergebnisse liegen in der Art der Zellwand eines Bakteriums sowie in der Sekundärstruktur der 16S rRNA begründet (Moter und Göbel, 2000). Beispielsweise kann der ausgeprägte Mureinsacculus grampositiver Bakterien die Penetration der Sonde durch die Zellwand behindern (Felske et al., 1998b). Durch Verwendung etablierter Oligonukleotidonden (EUB338^{Cy3}) und entsprechender Kontrollen (*Dehalobacter restrictus*) konnten solche Einflußfaktoren jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine Ausnahme stellten die Hybridisierungen mit den Sonden a21^{Cy3}, a24^{Cy3} und a25^{Cy3} dar, weil in diesen Fällen weder etablierte Sonden noch Positivkontrollen verfügbar waren.

Der Grund für die negativen Ergebnisse der FISH-Untersuchungen bei Verwendung bakterienspezifischer Oligonukleotidsonden war vermutlich die vergleichsweise harsche Vorbehandlung des fixierten Probenmaterials, die in einer Schädigung bakterieller Zellen resultierte. Die in der DCP-dechlorierenden Population präsenten Archaea waren von dieser Probenvorbehandlung offenbar weit weniger betroffen, da in allen Proben *Methanomethylovorans hollandica* sowie *Methanosaeta concilii* mittels FISH nachgewiesen werden konnten. Somit bestätigten die Ergebnisse der FISH die der Klonbibliotheken B und C. Die fast ausschließliche Besiedelung eines in den Reaktor eingebrachten Objektträgers (Probe S2) mit *Methanomethylovorans hollandica* stellte einen Hinweis auf die Dominanz dieser Art innerhalb der DCP-dechlorierenden Reaktorpopulation dar.

4.3 Rückschlüsse auf den Metabolismus der DCP-dechlorierenden Bioreaktorkultur

Phylogenetische Untersuchungen lassen in begrenztem Umfang Rückschlüsse auf physiologische Prozesse innerhalb einer Population zu (Dojka et al., 1998). So wurden in der DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation zwei deutlich dominierende methanogene Spezies gefunden, *Methanomethylovorans hollandica* und *Methanosaeta concilii*. *Methanomethylovorans hollandica* ist obligat methylotroph und verwertet als Substrat ausschließlich Methanol, Methylamine, Methanthiol sowie Dimethylsulfid (Lomans et al., 1999). Daher war anzunehmen, daß *Methanomethylovorans hollandica* einen Teil des kontinuierlich zugeführten Methanols direkt für die Methanogenese verwendet. Im Gegensatz dazu ist bei *Methanosaeta concilii* bislang nur eine acetoklastische Methanogenese bekannt, die das Vorhandensein von Acetat in der Kultur voraussetzt (Whitman et al., 1992). Acetat kann durch Umsetzung von Alkoholen (z.B. Methanol) durch die strikt anaeroben acetogenen Bakterien gebildet werden (Schlegel, 1995). Bei dieser Reaktion entsteht neben Kohlendioxid auch Wasserstoff, dessen Vorhandensein für zahlreiche metabolische Prozesse (z.B. Methanogenese, Halorespiration, Sulfatreduktion) von zentraler Bedeutung ist. Zahlreiche acetogene Bakterien findet man beispielsweise innerhalb der Gattung *Clostridium* (Diekert, 1992). In der DCP-dechlorierenden Population wurden mehrere *Clostridium*-ähnliche Klone gefunden, so z.B. Klon SHA-123, der das Bakterium *Clostridium lituseburense* repräsentiert. *Clostridium lituseburense* bildet neben einer Reihe anderer organischer Säuren hauptsächlich Acetat durch proteo- wie auch saccharolytische Spaltung bei geringer Wasserstoffproduktion (Cato et al., 1986).

In vielen Fällen sind die wasserstoffproduzierenden acetogenen Bakterien mit den wasserstoffkonsumierenden methanogenen Archaea eng vergesellschaftet. Diese Syntrophie geht mit einem "Inter-Spezies-Wasserstoff-Transfer" einher, bei dem der Wasserstoff zwischen den beteiligten Mikroorganismen direkt, d.h. ohne Freisetzung ins Medium, übertragen wird. Dadurch wird eine niedrige Wasserstoffkonzentration im Medium erzeugt, die aus thermodynamischen Gesichtspunkten für eine ausreichend exergone Oxidation organischer Substanzen notwendig ist (Valentine et al., 1999). In Klonbibliothek A wurden 16S rDNA-Sequenzen der Gattungen *Syntrophus* und *Syntrophobacter* gefunden. *Syntrophus* und *Syntrophobacter* beziehen Energie durch anaerobe Oxidation diverser organischer Säuren zu Acetat und Wasserstoff in Syntrophie mit methanogenen Archaea (Wallrabenstein et al., 1995; Harmsen et al., 1998). Im Falle von *Syntrophus gentiana* und *Methanosaeta concilii* wurde in einer Mischkultur zusammen mit *Methanospirillum hungatei* oder *Desulfovibrio desulfuricans* eine syntrophe Wechselwirkung nachgewiesen (Schink, 1997). Die Anwesenheit von *Methanosaeta concilii* führte zu einer deutlich höheren Benzoatabbaurrate durch *Syntrophus gentiana*, während das vermehrt gebildete Acetat stöchiometrisch umgesetzt wurde. Es ist demzufolge wahrscheinlich, daß die in der DCP-dechlorierenden Population vorkommenden Spezies der Gattungen *Syntrophus* sowie *Syntrophobacter* in syntropher Wechselwirkung mit den methanogenen Archaea Wasserstoff sowie Acetat produzieren. Das in Klonbibliothek A nachgewiesene Bakterium *Acidaminobacter hydrogenoformans* ist ebenfalls in der Lage, syntroph mit einem wasserstoffkonsumierenden Mikroorganismus zu existieren (Meijer et al., 1999). Es setzt unterschiedliche Kohlenhydrate, Alkohole sowie organische Säuren um. Interessanterweise wurde *Acidaminobacter hydrogenoformans* auch in mehreren anaeroben Sedimentanreicherungskulturen gefunden, die Tetrachlorethen, cis-Dichlorethen und Vinylchlorid reduktiv dechlorieren (Löffler et al., 2000).

Der in der DCP-dechlorierenden Mischkultur erzeugte Wasserstoff wird nicht ausschließlich zur Bildung von Methan und Kohlendioxid durch methanogene Archaea verwertet. Wasserstoff stellt auch bei der reduktiven Umsetzung von DCP die wichtigste Elektronenquelle dar. In der hier untersuchten Bioreaktorpopulation wurde die reduktive Dechlorierung von DCP zu Propen als Kombination aus sequentieller Dechlorierung und Dehydrodehalogenierung identifiziert (Hauck und Hegemann, 1999). Dieser Befund deutete auf mehrere anaerobe DCP-umsetzende mikrobielle Ökotypen im Reaktor hin.

Im Rahmen der molekularen Diversitätsanalyse wurde *Dehalobacter restrictus* im Bioreaktor gefunden. Dieses Bakterium ist in der Lage, Tetra- bzw. Trichlorethen durch sequentielle Dechlorierung zu cis-1,2-Dichlorethen zu transformieren (Wild et al., 1996). Neben *Dehalobacter* vermögen u.a. Bakterien der Gattung *Dehalococcoides* Energie durch Halorespiration zu beziehen (Adrian et al., 2000; Maymó-Gatell, 1997). Sequenzen dieser Organismengruppe wurden ebenfalls in der Bioreaktorkultur gefunden. Im

Gegensatz zu *Dehalobacter* ist *Dehalococcoides* in der Lage, eine Vielzahl aliphatischer wie aromatischer chlorierter Substrate vollständig umzusetzen. Die Bakterien beider Gattungen sind hinsichtlich ihres Stoffwechsels sehr spezialisiert, da sie die zum Zellwachstum notwendige Energie ausschließlich durch Chloratmung beziehen (El Fantroussi et al., 1998). Folglich ist davon auszugehen, daß *Dehalobacter*- bzw. *Dehalococcoides*-ähnliche Bakterien auch an der reduktiven Dechlorierung des DCPs im Bioreaktor beteiligt sind. Da *Dehalobacter restrictus* überproportional angereichert und darüber hinaus zur dominierenden bakteriellen Spezies innerhalb des Reaktors wurde, wird eine Schlüsselrolle dieser Spezies innerhalb der reduktiven DCP-Dechlorierung angenommen. Diese Hypothese wird durch den Nachweis von Dehalogenasegenen in der DCP-dechlorierenden Reaktorpopulation gestützt (von Wintzingerode et al., 2001). Reduktive Dehalogenasen stehen im Mittelpunkt der bei der Halo-respiration stattfindenden enzymatischen Prozesse (Smidt et al., 2000). In der DCP-dechlorierenden Reaktorkultur wurden Dehalogenasegene gefunden, die Ähnlichkeiten zu *Dehalobacter restrictus*-Dehalogenasegenen aufwiesen (CprA-ähnliche Dehalogenase-gene, von Wintzingerode et al., 2001). CprA-Dehalogenasegene wurden ursprünglich in *Desulfitobacterium dehalogenans* nachgewiesen. Dieses Bakterium vermag sowohl chlorierte Phenole als auch Tetrachlorethen reduktiv zu dechlorieren (Gerritse et al., 1996).

Anhand bisher bekannten physiologischen (Hauck, 2000) sowie phylogenetischen Daten läßt sich ein vereinfachtes Modell der wesentlichen Kohlenstoff- und Energieflüsse in der anaeroben DCP-dechlorierenden Bioreaktorpopulation aufstellen (Abb. 4.1). Das Modell verdeutlicht noch einmal die zentrale Rolle des mikrobiell produzierten Wasserstoffs und die daraus resultierende Konkurrenzsituation wasserstoffverwertender Mikroorganismen. Eine externe Zufuhr von Wasserstoff zur Reaktorpopulation führte auch konsequenterweise zu einer schnell einsetzenden, deutlichen Steigerung der DCP-Transformation. Dieses Ergebnis stellte einen weiteren Hinweis für eine direkte Beteiligung von *Dehalobacter* und *Dehalococcoides* spp. an der Transformation des DCPs dar. Da die reduktiv dechlorierenden Mikroorganismen eine höhere Affinität zu Wasserstoff besitzen, als beispielsweise Methanogene oder Sulfatreduzierer, können sie sich bei geringen H₂-Konzentrationen gegenüber den anderen Organismengruppen in der Mischkultur durchsetzen (Löffler et al., 1999). Allerdings ist eine Konkurrenz zwischen halo-respirierenden und sulfatreduzierenden Bakterien in der Reaktorkultur unwahrscheinlich, da im verwendeten Mineralsalzmedium kein Sulfat enthalten war. Allerdings wurden Klonsequenzen gefunden, die nahezu identisch zum sulfatreduzierenden Isolat BKA11 (Wind et al., 1999) waren und demzufolge eine Sulfatreduktion in der Population vermuten ließen.

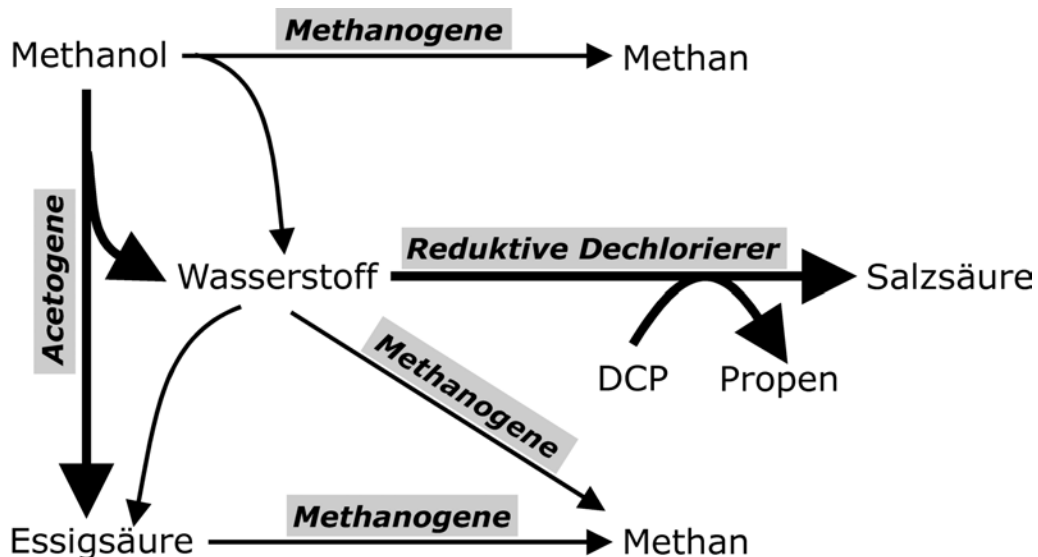


Abb. 4.1 Modell für den Kohlenstoff- und Energiefluß in der anaeroben DCP-dechlorierenden Bioreaktorkultur (modifiziert nach Maymó-Gatell et al., 1995). Verstärkte Pfeile symbolisieren bevorzugte Umsatzwege.

Möglicherweise wurden die notwendigen Sulfate durch Verunreinigungen der verwendeten Salze in den Reaktor eingetragen. Darüber hinaus spielen auch die Verbindungen eine Rolle, die nach dem Absterben von Mikroorganismen in das Medium freigesetzt werden. Vermutlich waren derartige Verbindungen die Ursache für die hohe bakterielle Diversität in der Reaktorkultur, die trotz nur zwei kontinuierlich zugeführter Substrate über einen langen Zeitraum bestehen blieb. Es kann somit als sicher angenommen werden, daß auch das Stoffwechselgeschehen in der Reaktorpopulation außerordentlich komplex ist und daß eine Vielzahl gleichgerichteter Umsätze simultan ablaufen (z.B. metabolische und kometabolische Dechlorierung). Da sich der überwiegende Teil der im Reaktor nachgewiesenen Mikroorganismen aus bislang nicht-kultivierten Bakterien zusammensetzt, können für diese Organismen keine sinnvollen Schlußfolgerungen hinsichtlich ihrer Physiologie gezogen werden.

4.4 Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung einer DCP-umsetzenden mikrobiellen Mischpopulation mit molekulargenetischen Methoden untersucht. Die Mikroorganismen dechlorierten in einem anaeroben kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor DCP vollständig zu Propen. Anhand der Analyse von 16S rDNA-Klonbibliotheken konnte gezeigt werden, daß die DCP-dechlorierende Reaktorpopulation über den gesamten Untersuchungszeitraum eine hohe mikrobielle Diversität aufwies. Da kurzfristige Schwankungen, wie etwa ein vorübergehendes Ansteigen des Redoxpotentials, keine

nachhaltigen Störungen des Abbaus nach sich zogen, führte die physiologische Vielfaltigkeit der Population offenbar zu einem störunanfälligen Reaktorverfahren, das eine konstante sowie effektive Dechlorierung des zugeführten DCPs ermöglichte.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß mikrobielle Lebensräume, in denen chlorierte Verbindungen unter anaeroben Verhältnissen reduktiv umgesetzt werden, eine spezifische Populationszusammensetzung aufweisen. Anhand der phylogenetischen Analyse wurden rDNA-Sequenzcluster definiert (SHA-I bis SHA-V), die spezifisch für reduktiv dechlorierende Süßwasserhabitate sind. Die in den SHA-Clustern zusammengefaßten Mikroorganismen stellen somit mögliche Indikatoren für die reduktive Dechlorierung dar. Der quantitative molekulargenetische Nachweis solcher Indikatororganismen ermöglicht ein kontinuierliches mikrobielles Prozeßmonitoring, mit dem die Kultur während des Auftretens kritischer Ereignisse (z.B. Anfahrphase des Reaktors, Schwankungen in der Abwasserzusammensetzung) überwacht werden kann (Brockman, 1995; Power et al., 1998; Stapleton et al., 1998). Auf diese Weise wäre eine effizientere Steuerung des Bioreaktors möglich, die wiederum zur einer erhöhten Standfestigkeit führen würde.

Cluster SHA-IV wird im wesentlichen durch das halorespirierende Bakterium *Dehalobacter restrictus* repräsentiert und eignet sich somit als Indikator für reduktive Dechlorierung. Dies konnte durch eine Kombination unterschiedlicher molekularer Methoden wie DGGE, 16S rDNA-Klonbibliotheksanalyse und QE-PCR gezeigt werden. *Dehalobacter restrictus* wurde im Gegensatz zu anderen Bakterienarten überproportional angereichert. Aufgrund der speziellen Physiologie von *Dehalobacter* spp. ist von einer direkten Beteiligung dieses Bakteriums an der reduktiven DCP-Umsetzung auszugehen. Neben *Dehalobacter restrictus* wurden auch Bakterien der Gattung *Dehalococcoides* im Bioreaktor nachgewiesen. Diese Mikroorganismen transformieren chlorierte Verbindungen ebenfalls durch Halorespiration und sind vermutlich an der reduktiven Umsetzung des DCPs beteiligt. Die physiologischen Eigenschaften von *Dehalobacter* und *Dehalococcoides* spp. ließen die Schlußfolgerung zu, daß die Verfügbarkeit von Wasserstoff von wesentlicher Bedeutung für die DCP-Transformation im Reaktor ist. Tatsächlich führte die Zugabe von Wasserstoff zum Bioreaktor zu einer Erhöhung der DCP-Transformationsrate. Demzufolge stellt diese Form der Biostimulation eine Möglichkeit dar, anaerobe Bioreaktorverfahren zur Transformation chlororganischer Verbindungen zu optimieren.

5 Literatur

- Abd El Haleem, D., von Wintzingerode, F., Moter, A., Moawad, H., Göbel, U. B. (2000).** Phylogenetic analysis of rhizosphere-associated β -subclass proteobacterial ammonia oxidizers in a municipal wastewater treatment plant based on rhizoremediation technology. *Lett Appl Microbiol* 31:34-38.
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, U., Görisch, H. (2000).** Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408:580-583.
- Akkermans, A. D. L., Sajjad Mirza, M., Harmsen, H. J. M., Blok, H. J., Herron, P. R., Sessitsch, A., Akkermans, W. M. (1994).** Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:185-194.
- Alard, P., Lantz, O., Sebagh, M., Calvo, C. F., Weill, D., Chavanel, G., Senik, A., Charpentier, B. (1993).** A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *Biotechniques* 15:730-737.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.
- Amann, R. I., Ludwig, W. (2000).** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* 24:555-565.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) - Public Health Statement (1989).** <http://atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/ToxProfiles/phs8912.html>
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. (1994).** Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1609-1613.
- Becker, S., Boger, P., Oehlmann, R., Ernst, A. (2000).** PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 66:4945-4953.
- Beitz, H., Schmidt, H., Herzel, F. (1994).** Occurrence, toxicological and ecotoxicological significance of pesticides in groundwater and surface water. In: Chemistry of plant protection. Pesticides in ground and surface water. Börner, H., Beitz, H. (Hrsg.). Berlin: Springer-Verlag, 3-56.
- Berliner Liste der Senatsverwaltung für Inneres, Berlin (1996).** Bewertungskriterien für die Beurteilung stofflicher Belastungen von Böden und Grundwasser in Berlin. *Amtsblatt von Berlin* 46 (15):957-987.
- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J., Triplett, E. W. (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 62:1935-1943.
- Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lepine, F., Bisailon, J. G. (1996).** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int J Syst Bacteriol* 46:1010-1015.
- Bouwer, E. J., Wright, J. P. (1988).** Transformations of trace halogenated aliphatics in anoxic biofilm columns. *J Contam Hydrol* 2:155-169.
- Boyle, J. S., Lew, A. M. (1995).** An inexpensive alternative to glassmilk for DNA-purification. *Trends in Genetics* 11:8.
- Brack, W., Rottler H., Frank, H. (1998).** Volatile fractions of landfill leachates and their effect on *Chlamydomonas reinhardtii*: In vivo chlorophyll A fluorescence. *Toxicol Chem* 17:1982-1991.
- Brockman, F. J. (1995).** Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of in situ bioremediation. *Mol Ecol* 4:567-578.

- BUA (1995).** 1,2-Dichlorpropan. Beratergremium für umweltrelevante Abfallstoffe (BUA) der Gesellschaft deutscher Chemiker (GDCh), Stoffbericht 155. Stuttgart: S. Hirzel Verlag.
- Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M. (2000).** Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:573-606.
- Cato, E. P., George, W. L., Finegold, S. M. (1986).** The genus *Clostridium*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath, H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. Holt. J. G. (Edit.). Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1141-1200.
- Chandler, D. P., Frederickson, J. K., Brockman, F. J. (1997).** Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* 6:475-482.
- Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Göbel, U. B. (1994).** Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun* 62:1889-1895.
- Christiansen, N., Ahring, B. K. (1996).** *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 46:442-448.
- Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. (2000).** Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66:5116-5122.
- Criddle, C. S., McCarthy, P. L., Elliot, M. C., Barker, J. F. (1986).** Reduction of hexachloroethane to tetrachloroethylene in groundwater. *J Contam Hydrol* 1:133-142.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1989).** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243:1360-1362.
- Diekert, G. (1992).** The acetogenic bacteria. In: The prokaryotes. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Edit.). New York: Springer-Verlag, 517-533.
- Diekert, G. (1995).** Reduktive Dechlorierung als respiratorischer Prozeß in anaeroben Bakterien. In: Mikrobielle Eliminierung von chlororganischen Verbindungen, Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Nr. 6. Berlin: Technische Universität Berlin, 149-158.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., Pace, N. R. (1998).** Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 64:3869-3877.
- Dojka, M. A., Harris, J. K., Pace, N. R. (2000).** Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66:1617-1621.
- Dunbar, J., Ticknor, L. O., Kuske, C. R. (2000).** Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol* 66:2943-2950.
- El Fantroussi, S., Naveau, H., Agathos, S. N. (1998).** Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol Prog* 14:167-188.
- Engelen, B., Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.-P., Backhaus, H. (1998).** Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl Environ Microbiol* 64:2814-2821.
- Farrelly, V., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. (1995).** Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 61:2798-2801.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- Felske, A., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M. (1998a).** Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Environ Microbiol* 64:4581-4587.
- Felske, A., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M. (1998b).** In situ detection of an uncultured predominant bacillus in Dutch grassland soils. *Appl Environ Microbiol* 64:4588-4590.
- Ferris, M. J., Muyzer, G., Ward, D. M. (1996).** Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* 62:340-346.
- Fetzner, S., Lingens, F. (1994).** Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev* 58:641-685.
- Fetzner, S. (1998).** Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:633-657.
- Field, K. G., Gordon, D., Wright, T., Rappe, M., Urback, E., Vergin, K., Giovannoni, S. J. (1997).** Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:63-70.
- Friedrich, M., Springer, N., Ludwig, W., Schink, B. (1996).** Phylogenetic positions of *Desulfofustis glycolicus* gen. nov., sp. nov., and *Syntrophobotulus glycolicus* gen. nov., sp. nov., two new strict anaerobes growing with glycolic acid. *Int J Syst Bacteriol* 46:1065-1069.
- Garrett, R. H., Grisham, C. M. (1995).** Chemistry 420 - Principles of Biochemistry, 16S rRNA Secondary Structure. <http://www.nd.edu/~aseriann/rna.html>.
- Gerritse, J., Renard, V., Gomes, T. M. P., Lawson, P. A., Collins, M. D., Gottschal, J. C. (1996).** *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Arch Microbiol* 165:132-140.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M., Amann, R. (1999).** Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65:3721-3726.
- Göbel, U. B. (1995).** Phylogenetic amplification for the detection of uncultured bacteria and the analysis of complex microbiota. *J Microbiol Meth* 23:117-128.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. (1997).** Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 63:2802-2813.
- Grove, G., Szeto, S. Y., Liebscher, H., Hii, B., Zebarth, B. J. (1998).** Occurrence of 1,2-dichloropropane and 1,3-dichloropropene in the Abbotsford aquifer, British Columbia. *Wat Qual Res J Can* 33:51-71.
- Grüntzig, V., Nold, S. C., Zhou, J., Tiedje, J. M. (2001).** *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:760-768.
- Häggblom, M. M., Rivera, M. D., Young, L. Y. (1996).** Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids coupled to denitrification observed in a variety of sediment and soil samples. *FEMS Microbiol Lett* 144:213-219.
- Hamilton, W. A. (1987).** Microbial interactions and metabolic activities. In: Ecology of microbial environments. Flechter M., Gray, T. R. G., Jones, J. G. (Hrsg.). New York: Cambridge University Press, 124-149.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S. (1998).** Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol* 26:141-149.
- Harmsen, H. J., van Kuijk, B. L., Plugge, C. M., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M., Stams, A. J. (1998).** *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48:1383-1387.

- Hastings, R. C., Saunders, J. R., Hall, G. H., Pickup, R. W., McCarthy, A. J. (1998).** Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake. *Appl Environ Microbiol* 64:3674-3682.
- Hattori, T., Mitsui, H., Haga, H., Wakao, N., Shikano, S., Gorlach, K., Kasahara, Y., El-Beltagy, A., Hattori, R. (1997).** Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72:21-28.
- Hauck, R., Hegemann, W. (1999).** Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von 1,2-Dichlorpropan im Wirbelbettreaktor. *gwf Wasser Abwasser* 140:843-851.
- Hauck, R. (2000).** Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens zur mikrobiellen Elimination von 1,2-Dichlorpropan in kontaminierten Wässern. Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Nr. 13. Berlin: Technische Universität Berlin.
- Head, I. M., Saunders, J. R., Pickup, R. W. (1998).** Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35:1-21.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996).** Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994.
- Heldal, M., Bratbak, G. (1991).** Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 72:205-212.
- Hempel, D. C., Krull, R. (1996).** Biologische Behandlung von Abwässern mit schwerabbaubaren Inhaltsstoffen. In: Additiver Umweltschutz: Behandlung von Abwässern. Handbuch des Umweltschutzes und der Umweltschutztechnik. Brauer, H. (Hrsg.) Berlin: Springer-Verlag, 321-390.
- Hermansson, A., Lindgren, P. (2001).** Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 67:972-976.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992).** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413-417.
- Holden, P. W. (1986).** Pesticides and groundwater quality - issues and problems in four states. National Academy Press, Washington, D. C.
- Holliger, C., Schraa, G. (1994).** Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 15:297-305.
- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schuhmacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A. J. B. (1998).** *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch Microbiol* 169:313-321.
- Holliger, C., Schumacher, W. (1994).** Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:239-246.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., Pace, N. R. (1998a).** Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180:366-376.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998b).** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180:4765-4774.
- Hunter-Cevera, J. C. (1998).** The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol* 1:278-285.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1986).** 1,2-Dichloropropane. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 41:131-137.
- Jones, L., Owen, S. A., Horrell, P., Burns, R. G. (1998).** Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Wat Res* 32:2542-2549.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism. Munro, H. N. (Edit.). New York: Academic Press, 21-132.

- Kageyama, A., Sakamoto, M., Benno, Y. (2000).** Rapid indentification and quantification of *Collinsella aerofaciens* using PCR. *FEMS Microbiol Let* 183:43-47.
- Kahlich, D., Wiechern, U., Lindner, J. (1993).** Propylene oxide. In: Ullman's encyclopedia of industrial chemistry. 5. Auflage. Vol. A22. Gerhartz, W., Elvers, B., (Hrsg.). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft.
- Kengen, S. W., Breidenbach, C. G., Felske, A., Stams, A. J., Schraa G., de Vos, W. M. (1999).** Reductive dechlorination of tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 65:2312-2316.
- Kolter, R., Siegele, D. A., Tormo, A. (1993).** The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47:855-874.
- Langer, E. (1986).** Chlorinated hydrocarbons, chloropropanes. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 5. Auflage, Vol. A6. Gerhartz, W., Elvers, B. (Hrsg.). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft.
- Larsen, N., Olsen, G. J., Maidak, B. L., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T. L., Woese, C. R. (1993).** The ribosomal database project. *Nucl Acids Res* 21:3021-3023.
- Leclerc, M., Delbes, C., Moletta, R., Godon, J. (2001).** Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol Ecol* 34:213-220.
- Lee D. H., Zo, Y. G., Kim, S. J. (1996).** Non-radioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 62:3112-3120.
- Leistra, M., Boesten, J. J. T. I. (1989).** Pesticide contamination of groundwater in western Europe. *Agric Ecosyst Environ* 26:369-389.
- Li, L., Kato, C., Horikoshi, K. (1999).** Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiv Conserv* 8:659-677.
- Liesack, W., Weyland, H., Stackebrandt, E. (1991).** Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophylic bacteria. *Microb Ecol* 21:191-198.
- Liesack, W., Stackebrandt, E. (1992).** Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material from an australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174, 5072-5078.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997).** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995).** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362.
- Löffler, F. E., Champine, J. E., Ritalahti, K. M., Sprague, S. J., Tiedje, J. M. (1997).** Complete reductive dechlorination of 1,2-dichloropropane by anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:2870-2875.
- Löffler, F. E., Tiedje, J. M., Sanford, R. A. (1999).** Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. *Appl Environ Microbiol* 65:4049-4056.
- Löffler, F. E., Sun, Q., Li, J., Tiedje, J. M. (2000).** 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl Environ Microbiol* 66:1369-1374.

- Lomans, B. P., Maas, R., Luderer, R., op den Camp, H. J., Pol, A., van der Drift, C., Vogels, G. D. (1999).** Isolation and characterization of *Methanomethylovorans hollandica* gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol. *Appl Environ Microbiol* 65:3641-3650.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1994).** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 15:155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K.-H. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19:554-568.
- Lyons, S. R., Griffen, A. L., Leys, E. J. (2000).** Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total Bacteria. *J Clin Microbiol* 38:2362-2365.
- Mägli, A., Wendt, M., Leisinger, T. (1996).** Isolation and characterization of *Dehalobacterium formicoaceticum* gen. nov. sp. nov., a strictly anaerobic bacterium utilizing dichloromethane as source of carbon and energy. *Arch Microbiol* 166:101-108.
- Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T. R., Szewzyk, U., Lawrence, J. R. (1999).** Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb Ecol* 37:225-237.
- Massol-Deyá, A., Whallon, J., Hickey, R. F., Tiedje, J. M. (1995).** Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* 61:769-777.
- Massol-Deyá, A., Weller, R., Ríos-Hernández, L., Zhou, J.-Z., Hickey, R. F., Tiedje, J. M. (1997).** Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 63:270-276.
- Mathews, S. A., Volp, K. M., Timms, P. (1999).** Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of σ -factors. *FEBS Letters* 458:354-358.
- Maymó-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J. M., Zinder, S. H. (1995).** Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl Environ Microbiol* 61:3928-3933.
- Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J. M., Zinder, S. H. (1997).** Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276:1568-1571.
- McGrath, J. E., Harfoot, C. G. (1997).** Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Appl Environ Microbiol* 63:3333-3335.
- Meierling, L. (1998).** Untersuchungen zur mikrobiellen Reinigung organisch belasteter Grundwässer in Kombination mit chemischen und physikalischen Verfahren, Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Nr. 5. Berlin: Technische Universität Berlin.
- Meijer, W. G., Nienhuis-Kuiper, M. E., Hansen, T. A. (1999).** Fermentative bacteria from estuarine mud: phylogenetic position of *Acidaminobacter hydrogeniformans* and description of a new type of gram-negative, propionigenic bacterium as *Propionibacter pelophilus* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:1039-1044.
- Merriman, J. C., Struger, J., Szawiola, R. S. (1991).** Distribution of 1,3-dichloropropene and 1,2-dichloropropane in Big Creek Watershed. *Bull Environ Contam Toxicol* 47:572-579.
- Mohn, W. W., Tiedje, J. M. (1992).** Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev* 56:482-507.
- Moter, A., Göbel, U. B. (2000).** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 41:85-112.

- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T., Orrego, C. (1996).** Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* 62:2676-2680.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2:317-322.
- Mylvaganam, S., Dennis, P. P. (1992).** Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Genetics* 130:399-410.
- Neumann, A., Scholz-Muramatsu, H., Diekert, G. (1994).** Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol* 162:295-301.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaird, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996).** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178:5636-5643.
- Oldenhuis, R., Vink, R. L. J. M., Janssen, D. B., Witholt, B. (1989).** Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 55:2819-2826.
- Pillai, S. D., Josephson, K. L., Bailey, R. L., Gerba, C. P., Pepper, I. L. (1991).** Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 57:2283-2286.
- Power, M., van der Meer, J. R., Tchelet, R., Egli, T., Eggen, R. (1998).** Molecular-based methods can contribute to assessments of toxicological risks and bioremediation strategies. *J Microbiol Meth* 32:107-119.
- Pulliam-Holoman, T. R., Elberson, M. A., Cutter, L. A., May, H. D., Sowers, K. R. (1998).** Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-ortho-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:3359-3367.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., McDonel, P. E., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., Zhou, J. (2001).** Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* 67:880-887.
- Rainey, F. A., Ward, N., Sly, L. I., Stackebrandt, E. (1994).** Dependence on the taxon composition of clone libraries for PCR amplified, naturally occurring 16S rDNA, on the primer pair and the cloning system used. *Experientia* 50:796-797.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H., Stackebrandt, E. (1996).** *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* 142:2087-2095.
- Rasche, M. E., Hyman, M. R., Arp, D. J. (1990).** Biodegradation of halogenated hydrocarbon fumigants by nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:2568-2571.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Amann, R. (2001).** Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl Environ Microbiol* 67:387-395.
- Reysenbach, A.-L., Giver, L. J., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1992).** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58:3417-3418.

- Rippen, G. (1994).** Handbuch der Umweltchemikalien: Datensammlung über Umweltchemikalien, 25. Ergänzungslieferung. Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft.
- Rochelle, P. A., Cragg, B. A., Fry, J. C., Parkes, R. J., Weightman, A. J. (1994).** Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 15:215-225.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 25:39-67.
- Roszak, D. B., Colwell, R. R. (1987).** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365-379.
- Saitou, N., Nei, M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour, N. Y: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanford, R. A., Cole, J. R., Löffler, F. E., Tiedje, J. M. (1996).** Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* 62:3800-3808.
- Schink, B. (1997).** Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:262-280.
- Schlegel, H. G. (1995).** Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schlötelburg, C., Gluz, M., Popovic, M., Merchuk, J. C. (1999).** Characterization of an airlift reactor with helical flow promoters. *Can J Chem Eng* 77:804-810.
- Schlöter, M., Leubhn, M., Heulin, T., Hartmann, A. (2000).** Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol Rev* 24:647-660.
- Schmidt, J. E., Ahring, B. K. (1999).** Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Appl Environ Microbiol* 65:1050-1054.
- Schuppler, M., Mertens, F., Schön, G., Göbel, U. B. (1995).** Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology* 141:513-521.
- Sharak-Genthner, B. R., Price, W. A., Pritchard, P. H. (1989).** Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* 55:1472-1476.
- Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984).** General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol* 48:850-857.
- Sienel, G., Rieth, R., Rowbottom, K. F. (1987).** Epoxides. In: Ullmanns encyclopedia of industrial chemistry. 5. Auflage, Vol. A9. Gerhartz, W., Elvers, B. (Hrsg.). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R., Mackie, R. I. (1999).** Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Meth* 36:167-179.
- Smidt, H., Akkermans, A. D., van der Oost, J., de Vos, W. M. (2000).** Halorespiring bacteria-molecular characterization and detection. *Enzyme Microb Technol* 27:812-820.
- Speksnijder, A. G., Kowalchuk, G. A., de Jong, S., Kline, E., Stephen, J. R., Laanbroek, H. J. (2001).** Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol* 67:469-472.
- Squillace, P. J., Moran, M. J., Lapham, W. W., Price, C. V., Clawges, R. M., Zogorski, J. S. (1999).** Volatile organic compounds in untreated ambient groundwater of the United States, 1985 - 1995. *Environ Science Technol* 33:4176-4187.

- Stackebrandt, E., Liesack, W., Goebel, B. M. (1993).** Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J* 7:232-236.
- Stackebrandt, E. Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849.
- Stapleton, R. D., Ripp, S., Jimenez, L., Cheol-Koh, S., Fleming, J. T., Gregory, I. R., Sayler, G. S. (1998).** Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization. *J Microbiol Meth* 32:165-178.
- Starnick, J. (1999).** Chlorverbindungen - Woher kommen sie? Wohin gehen sie? Eine Einschätzung des Gefährdungspotentials. In: Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Behandlung von Abwässern mit halogenorganischen Verbindungen. Berlin: Technische Universität Berlin, 13-28.
- Stuart, S. L., Woods, S. L., Lemmon, T. L., Ingle Jr., J. D. (1998).** The effect of redox potential changes on reductive dechlorination of pentachlorophenol and the degradation of acetate by a mixed methanogenic culture. *Biotechnol Bioeng* 63:69-78.
- Suzuki, M. T., Taylor, L. T., DeLong, E. F. (2000).** Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl Environ Microbiol* 66:4605-4614.
- Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J. (1996).** Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62:625-630.
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A. A. (1992).** Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13:444-449.
- Tartakovsky, B., Hawari, J., Guiot, S. R. (2000).** Enhanced dechlorination of Aroclor 1242 in an anaerobic continuous bioreactor. *Wat Res* 34:85-92.
- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R., Goksoyr, J. (1990a).** Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:776-781.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F. L. (1990b).** High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:782-787.
- Traunecker, J., Preuss, A., Diekert, G. (1991).** Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 156:416-421.
- Tsai, Y.-L., Olson, B. H. (1991).** Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* 57:1070-1074.
- Valentine, D. L., Reeburgh, W. S., Blanton, D. C. (2000).** A culture apparatus for maintaining H₂ at sub-nanomolar concentrations. *J Microbiol Methods* 39:243-251.
- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud A., Soulas, G. (1997).** Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol Ecol* 24:279-285.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407-438.
- Vandenbergh, P. A., Kunka, B. S. (1988).** Metabolism of volatile chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 54:2578-2579.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U. B., Stackebrandt, E. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21:213-229.
- von Wintzingerode, F., Selent, B., Hegemann, W. Göbel, U. B. (1999).** Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* 65:283-286.

- von Wintzingerode, F., Landt, O., Ehrlich, A., Göbel, U. B. (2000).** Peptide nucleic acid-mediated PCR clamping as a useful supplement in the determination of microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 66:549-557.
- von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Hauck, R., Hegemann, W., Göbel, U. B. (2001).** Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia, dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane. *FEMS Microbiol Ecol* 35:189-196.
- Wallrabenstein, C., Gorny, N., Springer, N., Ludwig, W., Schink, B. (1995).** Pure culture of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 18:62-66.
- Weber, S., Stubner, S., Conrad, R. (2001).** Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Appl Environ Microbiol* 67:1318-1327.
- Weidner, S., Arnold, W., Pühler, A. (1996).** Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 62:766-771.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., Boone, D. R. (1992).** The methanogenic bacteria. In: The prokaryotes. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Edit.). New York, N. Y.:Springer-Verlag, 739-745.
- Wild, A., Hermann, R., Leisinger, T. (1996).** Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. *Biodegradation* 7:507-511.
- Wind, T., Stubner, S., Conrad, R. (1999).** Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots. *Syst Appl Microbiol* 22:269-279.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.
- Woo, T. H. S., Patel, B. K. C., Cinco, M., Smythe, L. D., Norris, M. A., Symonds, M. L., Dohnt, M. F., Piispanen, J. (1999).** Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. *J Microbiol Meth* 35:23-30.
- Xia, X., Bollinger, J., Ogram, A. (1995).** Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol Ecol* 4:17-28.
- Yu, Z., Martin, V. J. J., Mohn, W. W. (1999).** Occurrence of two resin acid-degrading bacteria and a gene encoding resin acid biodegradation in pulp and paper mill effluent biotreatment systems assayed by PCR. *Microb Ecol* 38:114-125.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R. I., Zeyer, J. (1997).** Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. *Arch Microbiol* 168:185-192.
- Zellner, G., Stackebrandt, E., Messner, P., Tindall, B. J., Conway de Macario, E., Kneifel, H., Sleytr, U. B., Winter, J. (1989).** *Methanocorpusculaceae* fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov. *Arch Microbiol* 151:381-390.
- Zou, S., Anders, K. M., Ferguson, J. F. (1999).** Pentachlorophenol dechlorination in fluidized-bed reactors under methanogenic conditions. *Bioremediation J* 3:93-104.
- Zwart, G., Hiorns, W. D., Methe, B. A., van Agterveld, M. P., Huismans, R., Nold, S. C., Zehr, J. P., Laanbroek, H. J. (1998).** Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Syst Appl Microbiol* 21:546-556.

6 Anhang

Tab. 6.1 *Methanaeta concilii*-ähnliche Klone und Isolate.

Zugriffsnummer	Bezeichnung
AJ009515	Klon SJD-114
AJ009514	Klon SJD-111
AJ009513	Klon SJD-107
AJ009512	Klon SJD-105
AJ009511	Klon SJD-103
AJ009510	Klon SJD-102
AJ009509	Klon SJC-125a
AJ009508	Klon SJC-11b
AJ288324	Klon AC20
AJ288323	Klon AC19
AJ288321	Klon AC106
AJ288318	Klon AC9
AJ288315	Klon AC7
AJ288313	Klon AC6
AJ288310	Klon AC3
X51423	<i>Methanothrix soehngenii</i>
AJ276397	<i>Methanosaeta</i> sp. AMPB-Zg
X16932	<i>Methanothrix soehngenii</i>
AF229777	Klon TA04
AF229775	Klon TA02
AF229774	Klon TA01
AF050611	Klon WCHD3-03
AB056043	Klon OS-18
AB056027	Klon OS-2
AB056001	Klon WSB-19

Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Schlötelburg, C., Gluz, M., Popovic, M., Merchuk, J. C. (1999). Characterization of an airlift reactor with helical flow promoters. *Can J Chem Eng* 77:804-810.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F., Hauck, R., Hegemann, W., Göbel, U. B. (2000). Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane-dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1505-1511.

von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Hauck, R., Hegemann, W., Göbel, U. B. (2001). Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia, dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane. *FEMS Microbiol Ecol* 35:189-196.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, C., Hauck, R., von Wintzingerode, F., Hegemann, W., Göbel, U. B. (2002). Microbial structure of an anaerobic bioreactor population that continuously dechlorinates 1,2-dichloropropane. *FEMS Microbiol Ecol* (akzeptiert).

von Wintzingerode, F., Böcker, S., Schlötelburg, C., Chiu, N. H. L., Storm, N., Jurinke, C., Cantor, C. R., Göbel, U. B., van den Boom, D. (2002). Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: A novel tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci USA* (eingereicht zur Publikation).

Konferenzbeiträge und sonstige Publikationen

von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Abd El Haleem, D. (1998). A new rapid screening method for environmental 16S rDNA clone libraries. Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, Berlin, 24.-25.4.1998.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F., Göbel, U. B. (1998). Molecular characterization of anaerobic 1,2-dichloropropane transforming enrichment cultures. Körper Symposium on Molecular and Microsensor Studies of Microbial Communities, Bremen, 7.-11.9.1998.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F., Hauck, R., Hegemann, W., Göbel, U. B. (1999). Bacteria of an anaerobic 1,2-dichloropropane dechlorinating mixed culture are phylogenetically related to those of other anaerobic dechlorinating consortia. ASM Conference on Microbial Diversity, Chicago, Illinois, 5.-8.8.1999.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, F., Hauck, R., Bergmüller, C., Hegemann, W., Göbel, U. B. (1999). Molecular characterization of 1,2-dichloropropane transforming mixed cultures. Treatment of wastewaters with halogenated organic compounds. Colloquium at the Technische Universität Berlin, Berlin, 15.-16.11.1999.

Schlötelburg, C., Bergmüller, C., Hauck, R., von Wintzingerode, F., Hegemann, W., Landt, O., Göbel, U. B. (2000). Microbial population structure and dynamics of an anaerobic, 1,2-dichloropropane (DCP) dechlorinating bioreactor. Microbiology 2000. 1. Gemeinsamer Kongreß der DGHM, ÖGHMP und VAAM. München, 12.-16.3.2000.

Schlötelburg, C., Bergmüller, C., Hauck, R., von Wintzingerode, F., Hegemann, W., Landt, O., Göbel, U. B. (2000). Molecular analysis of microbial population structure and dynamics within an anaerobic 1,2-dichloropropane dechlorinating bioreactor. 100th ASM General Meeting, Los Angeles, Kalifornien, 21.-25.5.2000.

Schlötelburg, C., von Wintzingerode, C., Göbel, U. B. (2001). Structure and dynamics of an anaerobic 1,2-dichloropropane dechlorinating bioreactor culture. Colloquium at the Technische Universität Berlin, Berlin, 2.-3.4.2001.

von Wintzingerode, F., Schlötelburg, C., Göbel, U. B. (2001). Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia. Colloquium at the Technische Universität Berlin, Berlin, 2.-3.4.2001.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Cord Schlötelburg
geb. 20.08.1969 in Oldenburg, Niedersachsen

Ausbildung

1.8.1986 - 17.7.1989	Berufsausbildung zum Biologielaboranten bei der Landwirtschaftskammer Weser-Ems
15.8.1989 - 25.6.1990	Fachhochschulreife an der Fachoberschule Bremen
1.4.1992 - 7.4.1997	Studium der Biotechnologie an der Technischen Fachhochschule Berlin
1.5.1997 - 7.12.2001	Promotion am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Zivildienst

1.9.1990 - 30.11.1991	Zivildienst als Rettungssanitäter bei der Johanniter-Unfall-Hilfe, Oldenburg
-----------------------	--

Praktika

28.3.1994 - 29.7.1994	Industriepraktikum in der Abteilung Technische Prozeßtechnik der Bayer AG, Wuppertal
-----------------------	--

Auslandsaufenthalte

1.6.1996 - 1.12.1996	Praktischer Teil der Diplomarbeit an der Ben-Gurion-University of the Negev, Beer-Sheva, Israel
----------------------	---

Auszeichnungen

1989	2. Platz im Landesberufswettbewerb
1997	Ehrenurkunde der Technischen Fachhochschule Berlin
1997	Preis der Max Buchner-Forschungstiftung

Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von März 1998 bis November 2000 am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité in Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. U. B. Göbel danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit sowie für die stetigen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen. Bei Herrn Prof. Dr. T. Börner und Herrn Prof. H. Görisch bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Popovic für seine Unterstützung meiner Arbeit, die sich auch auf die Zeit nach meinem Biotechnologiestudium an der TFH-Berlin erstreckte. Mein besonderer Dank gilt Dr. Regine Hauck für das freundschaftliche und produktive Zusammenarbeiten, Dr. Friedrich von Wintzingerode für den stetigen wissenschaftlichen Dialog, Claudia von Wintzingerode für die Arbeiten im Rahmen der DGGE-Analyse und Olfert Landt für die Bereitstellung des LightCyclers. Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, insbesondere bei Marco Kachler, Aysun Karatas, Marie Knüwer, Dr. Michael Lefmann, Dr. Klaus Heuner, Dr. Annette Moter, Tina Fiedler, Cindy Hefenbrock, Michaela Müller, Angela Pohlisch und Ute Schöber, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, den 16. Juli 2001